

Wykaz skrótów do rozdziału 2

APAP – paracetamol
APS – kwas adenylosiarkowy
CSN – centralny system nerwowy
CST – γ -cystationaza
CySNO – S-nitrozocysteina
CysSO₃H – kwas cysteinosulfonowy
Cy-S-X – S-koniugaty cysteiny
GSH – zredukowany glutation
GSX – S-koniugaty glutationu
 γ -GT – γ -glutamylotranspeptydaza
MPST – siarkotransferaza-3-merkaptopirogronianowa
NMDA – receptory N-metylo-D-asparaginianowe
NAC – N-acetylocysteina
NAPQI – para-benzochinono-imina
OTC – kwas 2-okso-tiazolidyno-4-karboksylowy
PAPS – kwas 3'-fosfoadenylosiarkowy
RFT – reaktywne formy tlenu
RSSH – wodoronadsiarczki
RS[•] – rodnik tiylowy
RSS[•] – rodnik nadtiylowy
5-S-Cys-DA – 5-S-cysteinyldopamina

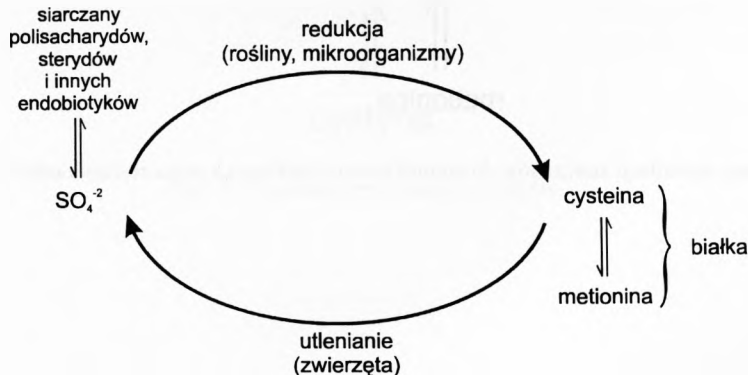
2. CYSTEINA

Metabolizm, biologiczna rola i przyczyny toksyczności

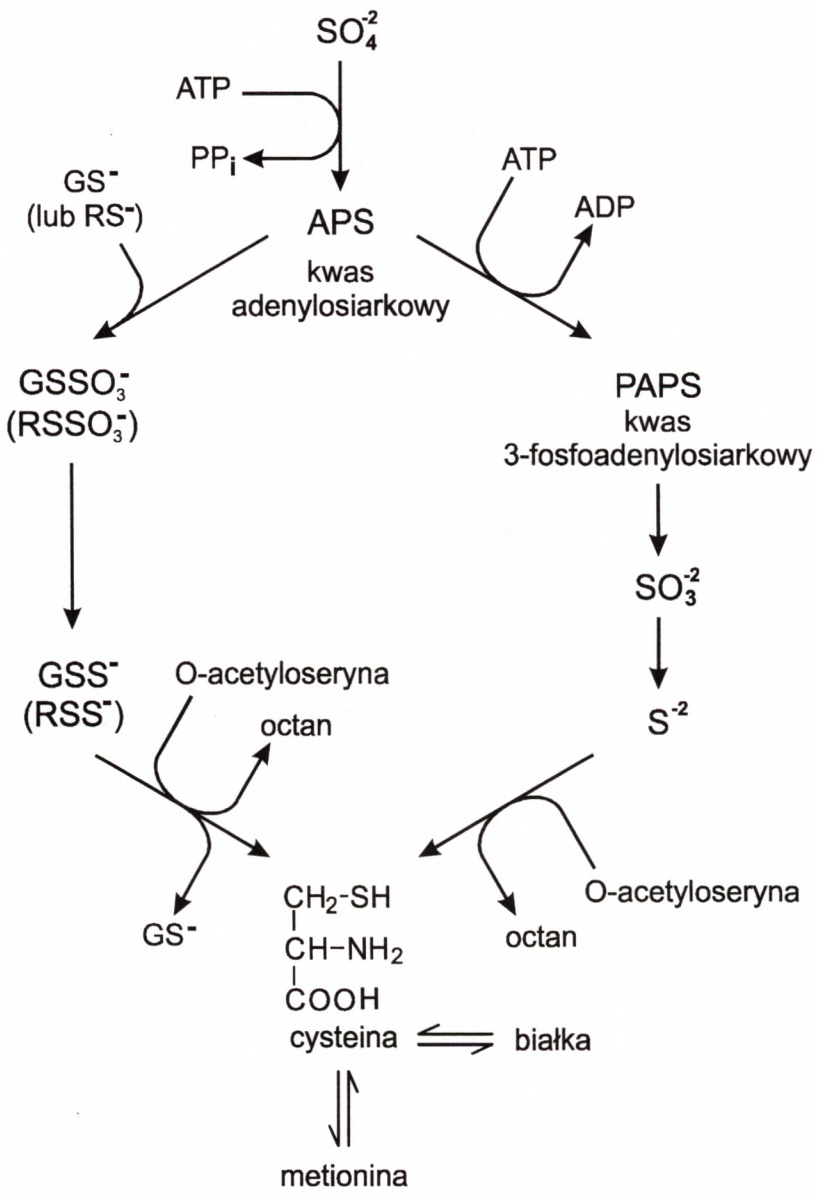
Lidia Włodek, Małgorzata Iciek

2.1. Wprowadzenie

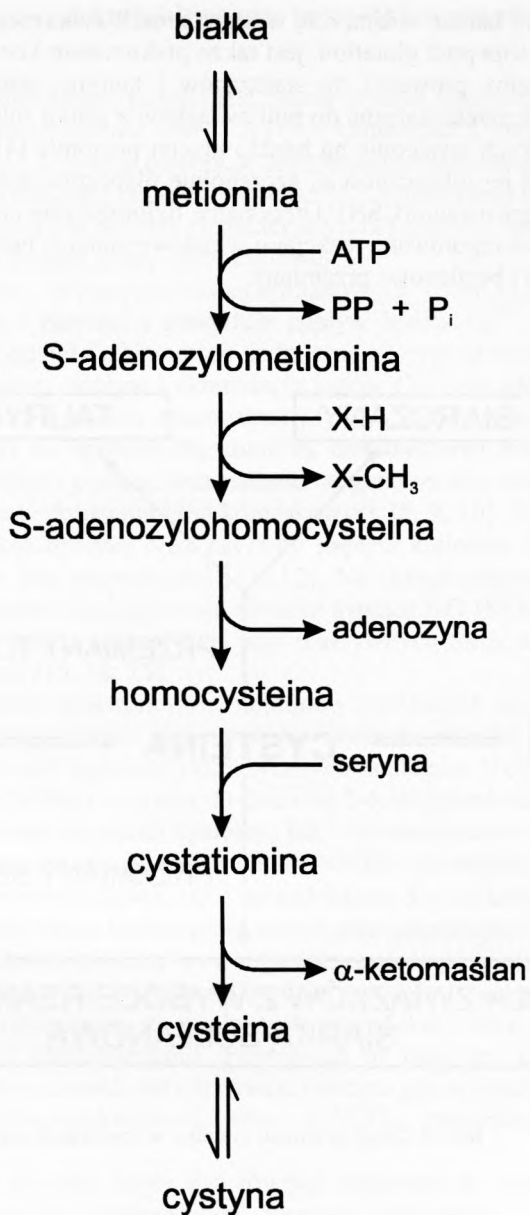
W przyrodzie spotykamy się, podobnie jak z obiegiem azotu i węgla, również z obiegiem siarki. Rośliny i liczne mikroorganizmy wykazują zdolność redukcyjnej asymilacji siarczanów z powstawaniem aminokwasów siarkowych – metioniny i cysteiny, które następnie w organizmach zwierzęcych ulegają tlenowej biodegradacji ponownie do siarczanów (ryc. 1) [prace przeglądowe: 1, 2]. Biosynteza cysteiny z siarczanów może przebiegać dwoma szlakami enzymatycznymi, tj. poprzez kwas adenylosiarkowy (APS) oraz poprzez kwas 3-fosfoadenylosiarkowy (PAPS) (ryc. 2) [2]. Na drodze pierwszej powstający APS reaguje z tiolami (RSH) do tiosulfonianów (RSSO_3^-) redukowanych następnie do nadsiarczoków RSS^- , których reakcja z O-acetyloseryną prowadzi do cysteiny [3]. Droga druga, przebiegająca poprzez PAPS, obejmuje kolejne reakcje redukcji siarczanów do siarczynów, redukowanych następnie do siarczoków, których reakcja z O-acetyloseryną prowadzi do powstania cysteiny [1, 2]. Istnieją mikroorganizmy wykazujące możliwość redukcji siarczanów jedynie do siarczoków ($-\text{S}^-$) [2]. W przewodzie pokarmowym ssaków związki siarki ulegają absorpcji wyłącznie w postaci aminokwasów, takich jak metionina, cysteina i odpowiadający jej disiarczek cystyna, oraz pod postacią różnych tioeterów, najczęściej pochodzenia roślinnego. Metionina w komórkach ssaków może być źródłem cysteiny, dlatego przy jej dostatecznej ilości w diecie cysteina przestaje być aminokwasem niezbędnym (ryc. 3).



Ryc. 1. Obieg siarki w przyrodzie

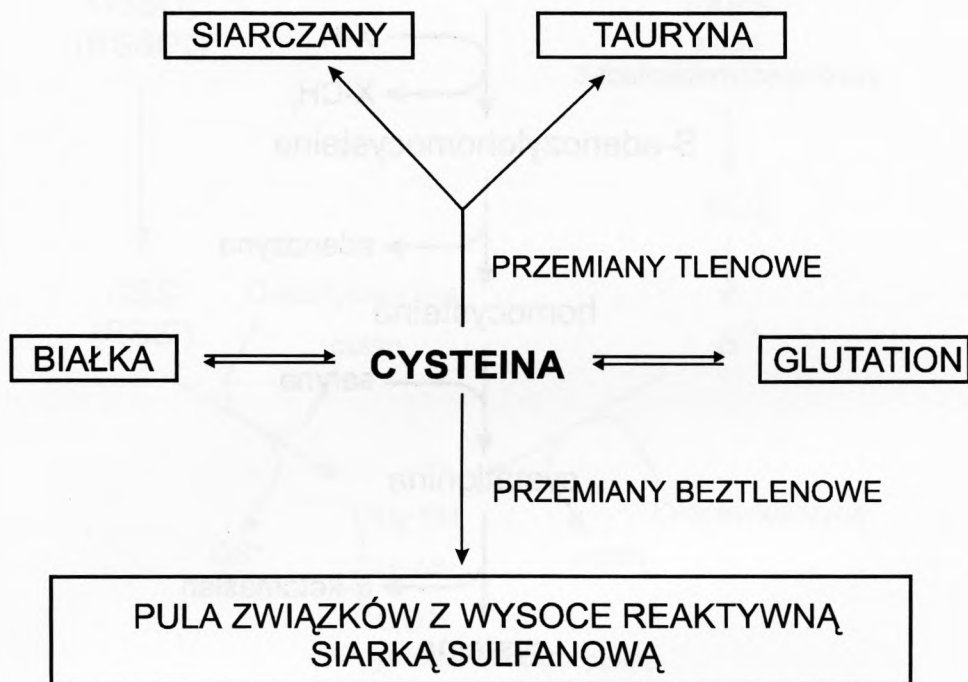


Ryc. 2. Drogi asymilacji siarczanów do aminokwasów siarkowych przez rośliny i mikroorganizmy



Ryc. 3. Przemiany metioniny w cysteinę

Cysteina pełni bardzo ważną rolę w organizmach zwierzęcych, ulega wbudowywaniu w białka, w tripeptyd glutation, jest także prekursorem koenzymu A. Tlenowa biodegradacja cysteiny prowadzi do siarczanów i tauryny, natomiast w beztlenowych przemianach jest przekształcana do puli związków z siarką sulfanową [1] (ryc. 4). Cysteina w komórkach występuje na bardzo niskim poziomie [4], co jest mechanizmem obronnym przed jej toksycznością, szczególnie niebezpieczną w stosunku do centralnego systemu nerwowego (CSN). Utrzymanie fizjologicznie niskiego stężenia cysteiny w komórkach jest regulowane reakcjami wbudowywania w białka i w peptydy, a także poprzez tlenowe i beztlenowe przemiany.



Ryc. 4. Drogi przemian cysteiny w komórkach ssaków

2.2. Dlaczego cysteina jest aminokwasem neurotoksycznym?

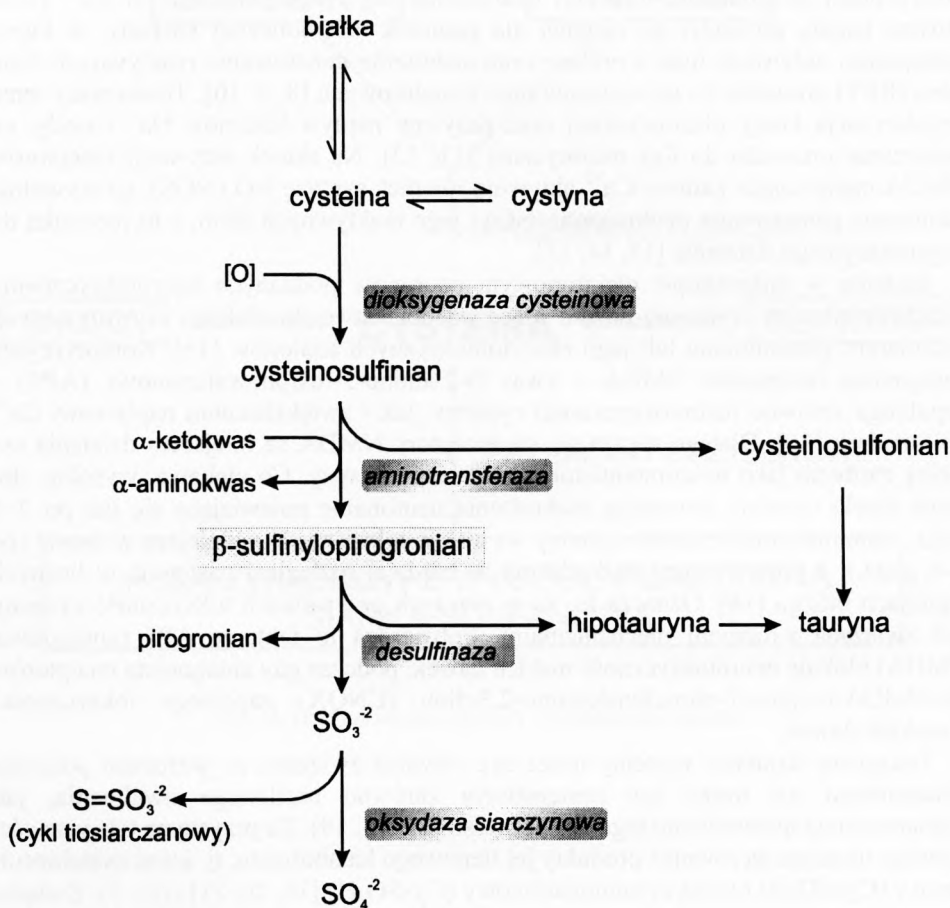
Cysteina w swej zredukowanej postaci jest tiolem wysoce toksycznym w stosunku do CSN, wywołuje spadek poziomu GSH i ATP w komórkach i prowadzi do zmian neurodegeneracyjnych [5]. Cysteina powoduje uszkodzenia neuronalne poprzez różnego typu mechanizmy wywołujące neurotoksyczność [6]. Aminokwas ten jest wyjątkową neurotoksyną, ponieważ nie posiada charakterystycznej dla wszystkich ekscytotoksycznych aminokwasów drugiej grupy karboksylowej.

Aktywacja receptorów N-metylo-D-asparaginianowych (NMDA) jest związana z procesami uczenia się i pamięci i powoduje napływ jonów Ca^{+2} przez związane z nimi jonofory [7] (p. rozdział 5). Natomiast nadmierna ekscytacja receptorów NMDA i związany z tym nadmierny napływ i akumulacja jonów Ca^{+2} jest główną przyczyną toksyczności glutaminianu i śmierci neuronalnej [8]. Gwałtowny napływ Ca^{+2} przez otwarte kanały prowadzi do zgubnej dla komórek metabolicznej kaskady, w której następująca aktywacja lipaz i proteaz oraz nadmierne generowanie reaktywnych form tlenu (RFT) prowadzi do uszkodzenia błon komórkowych [8, 9, 10]. Towarzyszy temu depolaryzacja błony plazmatycznej oraz pasywny napływ kationów Na^{+} i wody, co ostatecznie prowadzi do lizy osmotycznej [11, 12]. Na skutek aktywacji receptorów NMDA napływające kationy Ca^{+2} aktywują również syntazę NO (NOS), co wywołuje nadmierne generowanie tlenku azotu (NO) i jego reaktywnych form, a to prowadzi do degeneracyjnego działania [13, 14, 15].

Badania w mikroskopie elektronowym neuronów poddanych neurotoksycznemu działaniu cysteiny wykazują daleko idące podobieństwo do efektów wywoływanych nadmiarem glutaminianu lub jego ekscytotoksycznych analogów [16]. Kompetycyjny antagonist receptorów NMDA – kwas D-2-amino-5-fosfonowalerianowy (AP5) – zapobiega zarówno neurotoksyczności cysteiny, jak i zwiększonemu napływowi Ca^{+2} do komórek [16]. Dlatego uważa się, że receptory NMDA są miejscem działania cysteiny zarówno jako neuromodulatora, jak i neurotoksyny. Co ciekawe, wysokie, doustne dawki cysteiny powodują uszkodzenia neuronalne pojawiające się już po 2–3 godz., natomiast niskie dawki cysteiny wywołują toksyczność późniejszą w czasie (po 4–6 godz.), a obserwowane uszkodzenia są bardziej rozległe i następują w licznych regionach mózgu [16]. Oznacza to, że w obu tych przypadkach toksyczność cysteiny jest związana z różnymi mechanizmami. Potwierdza to fakt, że AP5 (antagonista NMDA) blokuje neurotoksyczność niskich dawek, podczas gdy antagonist receptorów nie-NMDA-6-cjano-7-nitrochinaksolino-2,3-dion (CNQX) zapobiega toksyczności wysokich dawek.

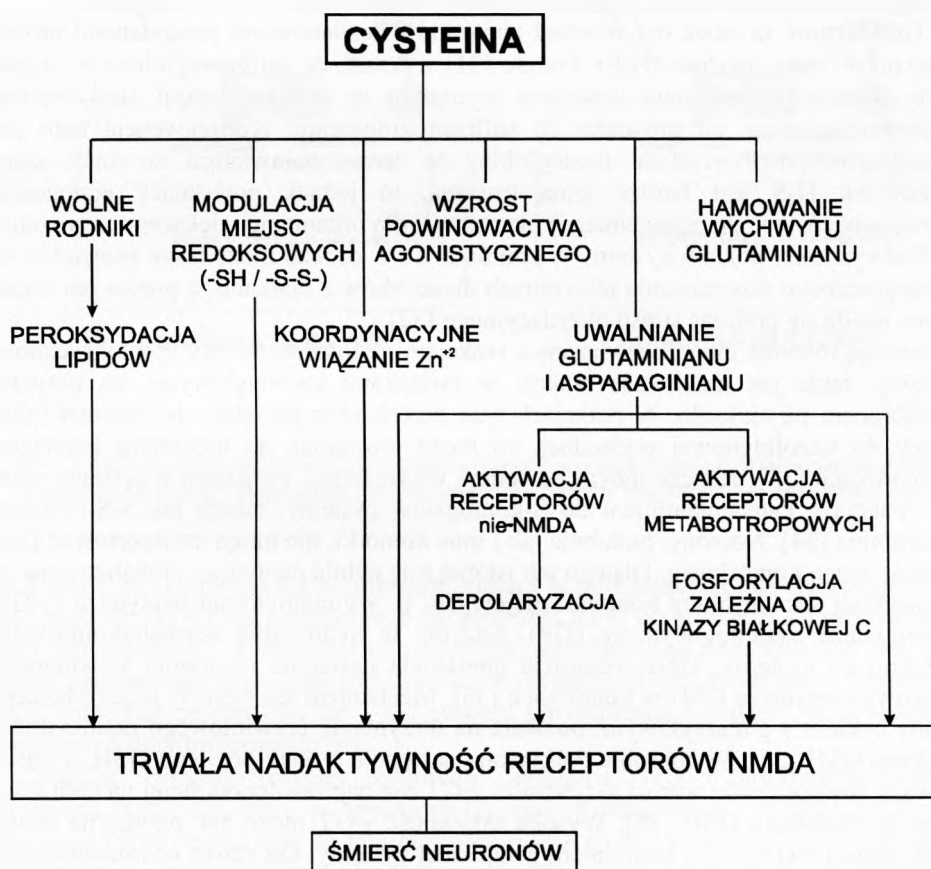
Toksyczne działanie cysteiny może być również związane ze wzrostem poziomu glutaminianu, co może być następstwem zarówno nasilonego uwalniania, jak i zahamowania metabolizmu tego aminokwasu [17, 18, 19]. Za przyczynę toksyczności cysteiny uważane są również produkty jej tlenowego katabolizmu, tj. kwas cysteinosulfonowy (CysSO_2H) i kwas cysteinosulfonowy (CysSO_3H) [16, 20, 21] (ryc. 5). Związki te są zaliczane do ekscytotoksyn działających synergistycznie do asparaginianu i glutaminianu. W tym jednak przypadku obserwuje się podobieństwo w strukturze pomiędzy CysSO_2H i CysSO_3H a asparaginianem i glutaminianem, ponieważ wszystkie te połączenia charakteryzuje obecność 2 grup o charakterze kwaśnym. W warunkach niedokrwienia mózgu następuje gwałtowny wzrost poziomu wolnej, zredukowanej

cysteiny [22]. Dlatego podczas reperfuzji może dochodzić do nasilonego utleniania się cysteiny do CysSO_2H oraz CysSO_3H i związanych z tym neuronalnych uszkodzeń [23]. Co jednak ciekawe, sama cysteina jest dwukrotnie bardziej toksyczna od CysSO_3H , co potwierdza, że jako aminokwas dysponuje większym spektrum możliwości toksycznego działania [16]. Toksyczność cysteiny wzrasta w obecności wodorowęglanu i jest związana z powstawaniem karbaminianu cysteiny – ekscytotoksycznego analogu NMDA [16, 24]. Mechanizmy toksyczności CysSO_3H i karbaminianu cysteiny nie wykluczają się wzajemnie i mogą działać niezależnie. Przy niedoborze aktywności oksydazy siarczynowej (ryc. 5) dochodzi do pojawiania się S-sulfocysteiny, pochodnej również wykazującej ekscytotoksyczne właściwości [16].



Ryc. 5. Tlenowy metabolizm cysteiny, prowadzący poprzez cysteinosulfinian i cysteinosulfonian do siarczanów (SO_4^{-2}) i tauryny

Swoje neurotoksyczne działanie cysteina może również wywierać poprzez możliwość kompleksowego wiązania kationu Zn^{2+} . Prowadzi to do odblokowania kanału kationowego receptora NMDA [16, 23], wzrostu poziomu glutaminianu, napływu kationów Ca^{+2} i związanej z tym neurotoksyczności. Za prawdopodobną przyczynę neurotoksycznego działania niskich dawek cysteiny przyjmuje się raczej jej możliwość kompleksowego wiązania Zn^{+2} , niż jej redukujące właściwości czy też możliwość utleniania się do $CysSO_3H$ [23, 25]. Toksyczność cysteiny jest również związana z możliwością bezpośredniej interakcji z grupami SH/-S-S- miejsc redokswych receptorów NMDA [14, 25, 26]. Prowadzi to do nasilenia działania ekscytotoksycznych aminokwasów na receptory NMDA. Zatem ekscytotoksyczne uszkodzenia i śmierć neuronalna mogą być wynikiem różnego typu interakcji pomiędzy cysteiną a receptorami NMDA, co przedstawia ryc. 6.

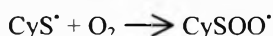


Ryc. 6. Prawdopodobne mechanizmy neurotoksyczności cysteiny związane z nadmierną aktywacją receptorów NMDA (wg Janaky [6] zmodyfikowana)

Przyczyny toksyczności cysteiny w komórkach są również związane z grupą hydrosulfidową (–SH) i możliwością spontanicznego utleniania się do disiarczku – cystyny [27].



Z reakcjami utleniania tioli do disiarczków jest zawsze związane powstawanie rodników tiolowych i reaktywnych form tlenu (RFT) (O_2^\cdot , $^\cdot\text{OH}$, H_2O_2) [27, 28]. Rodnik tiolowy cysteiny może również w reakcji z tlenem prowadzić do powstawania niebezpiecznego rodnika nadtlenkowego cysteiny [29, 30].

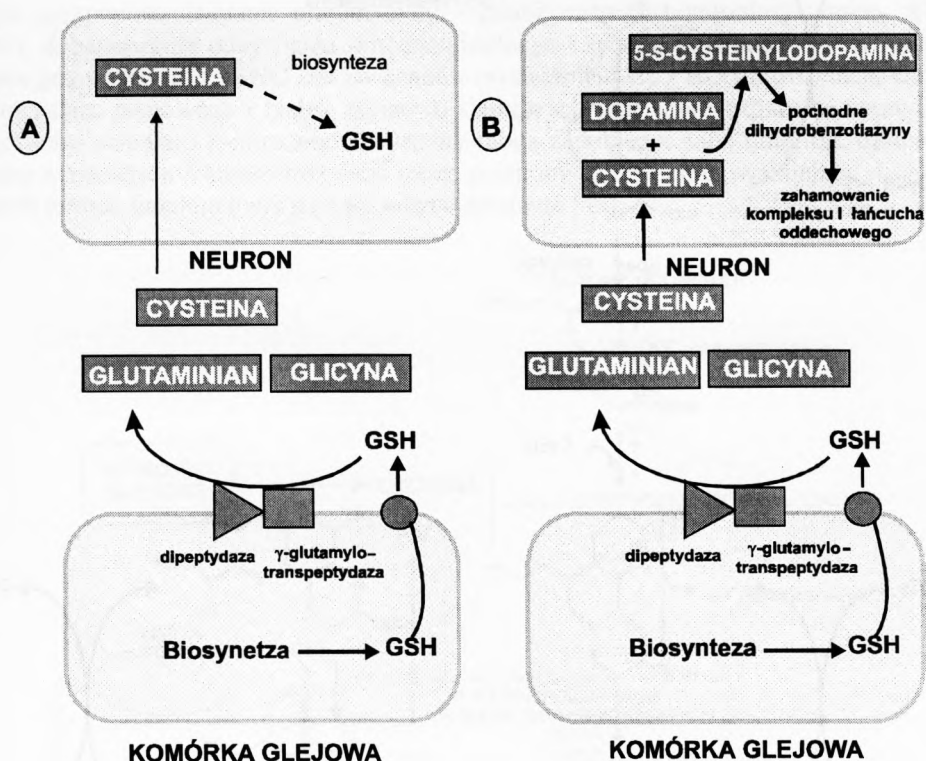


Toksyczność cysteiny, podobnie jak innych tioli, związana z grupą –SH staje się szczególnie niebezpieczna w obecności śladów jonów metali [30] (p. rozdział I).

Toksyczność ta może być również związana z beztlenowymi przemianami prowadzącymi do siarkowodoru (H_2S). Frendo [31] wykazał, że sulfhemoglobina w organizmie zwierzęcym powstaje wewnątrz erytrocytu w wyniku reakcji siarkowodoru z oksyhemoglobina, co prowadzi do sulfhemoglobinemii. Konsekwencją tego jest zmniejszenie powinowactwa hemoglobiny do tlenu i pojawiająca się sinica szara. Jakkolwiek H_2S jest bardzo silną trucizną, to jednak powstający endogennie (w przeciwieństwie do egzogenego) nie stanowi dla organizmu większego zagrożenia.

Podwyższony poziom cysteiny w komórkach i w osoczu może także prowadzić do niebezpiecznego powstawania mieszanych disiarczków z białkami, a proces ten szczególnie nasila się podczas stresu oksydacyjnego [32].

Istnieją również inne, niezwiązane z reakcjami redoks przyczyny cytotoksyczności cysteiny, takie jak możliwość reakcji ze związkami karbonyłowymi, na przykład z fosforanem pirydoksalu. W reakcjach tych przejściowo powstaje tiopółacetal cyklizujący do tiazolidynowej pochodnej, co może prowadzić do niedoboru koenzymu w komórkach [33]. Jeszcze innym powodem toksyczności związanej z cysteiną może być reakcja z katecholaminami do S-koniugatów cysteiny, takich jak 5-S-cysteiny-lodopamina [34]. Neurony, podobnie jak i inne komórki, nie mogą transportować GSH poprzez błonę komórkową. Dlatego tak istotną rolę pełnią peptydazy zlokalizowane po zewnętrznej stronie błony komórek glejowych, tj. γ -glutamylotranspeptydaza (γ -GT) i dipeptydaza cysteiloglicynowa (DP). Enzymy te hydrolizują zewnątrzkomórkowy glutation do cysteiny, której resorpcja umożliwia następnie neuronom wewnątrzkomórkową biosyntezę GSH w komórkach [35]. Mechanizm ten odkryty przez Meistera, zwany cyklem γ -glutamylowym, pozwala na utrzymanie prawidłowego neuronalnego poziomu GSH [35]. W chorobie Parkinsona następuje spadek poziomu GSH, a obserwowany równocześnie wzrost aktywności γ -GT ma najprawdopodobniej na celu kompensację niedoboru GSH [36]. Wysoka aktywność γ -GT może być przyczyną neurotoksyczności związanej z nadmiarem uwalnianej cysteiny. Do zmian neurodegenerujących dochodzi wtedy, kiedy cysteina w neuronach przestaje być substratem do biosyntezy GSH, lecz w reakcji z orto-chinonem dopaminy będzie ulegać przekształceniu do 5-S-cysteiny-lodopaminy (5-S-Cys-DA) [34] (ryc. 7). Powstająca 5-S-Cys-DA może w obecności cysteiny ulegać przekształceniu do niebezpiecznych S-koniugatów dihydrobenzotiazyny (ryc. 8) [37].



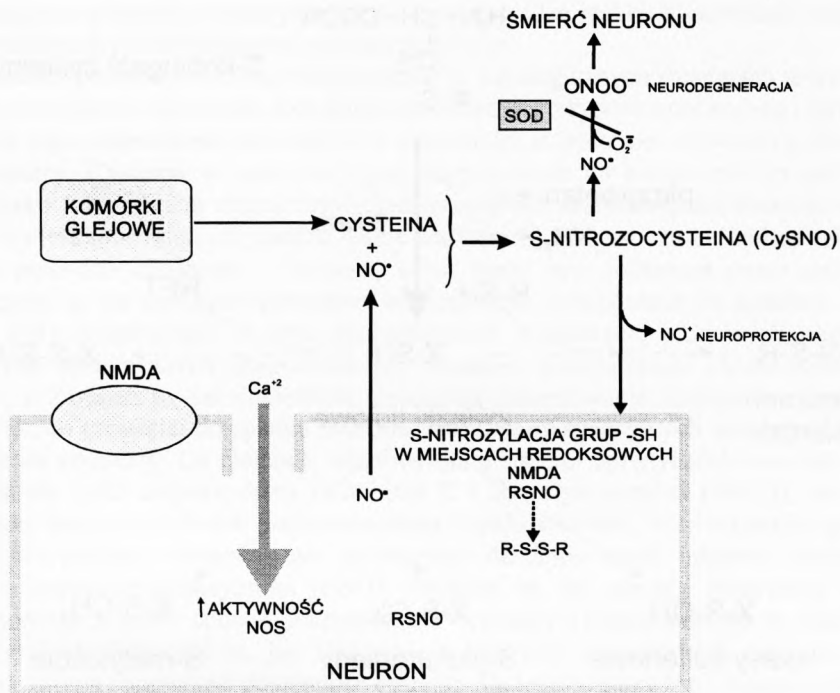
Ryc. 7. Hipotetyczny mechanizm neuroprotekcynowego i neurotoksycznego działania uwalnianej zewnątrzkomórkowo z dopaminergicznych neuronów cysteiny (wg Janaky [6] zmodyfikowana)

Związki te akumulują się w mitochondriach i w powstających licznych cyklach redoks stają się przyczyną nadmiernego generowania RFT, co prowadzi do nieodwracalnego zahamowania I kompleksu mitochondrialnego łańcucha oddechowego [38, 39]. Zatem neuroprotekcynowe działanie cysteiny w neuronach jest związane z biosyntezą GSH, natomiast neurotoksyczne – jest efektem powstawania 5-S-Cys-DA, a następnie pochodnych dihydrobenzotiazyny.

Cysteina wykazuje również możliwość „wiązaną” NO z powstaniem S-nitrozocysteiny (CySNO), która w obecności $O_2^{\cdot -}$ oraz w nieobecności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) może stać się neurotoksyczna [40] (p. rozdział 9). CySNO jest przykładem bardzo mało stabilnego S-nitrozotiolu, który z łatwością na drodze homolitycznej uwalnia tlenek azotu NO^{\cdot} , mogący w reakcji z $O_2^{\cdot -}$ przechodzić w toksyczny nad-tlenoazotyn ($ONOO^{\cdot -}$) [41] (ryc. 9). CySNO może również ulegać heterolitycznemu rozpadowi do kationu nitrozoniowego (NO^+) i powodować w miejscach redoksowych NMDA S-transnitrozylację grup $-SH$, prowadząc ostatecznie do powstania wiązań

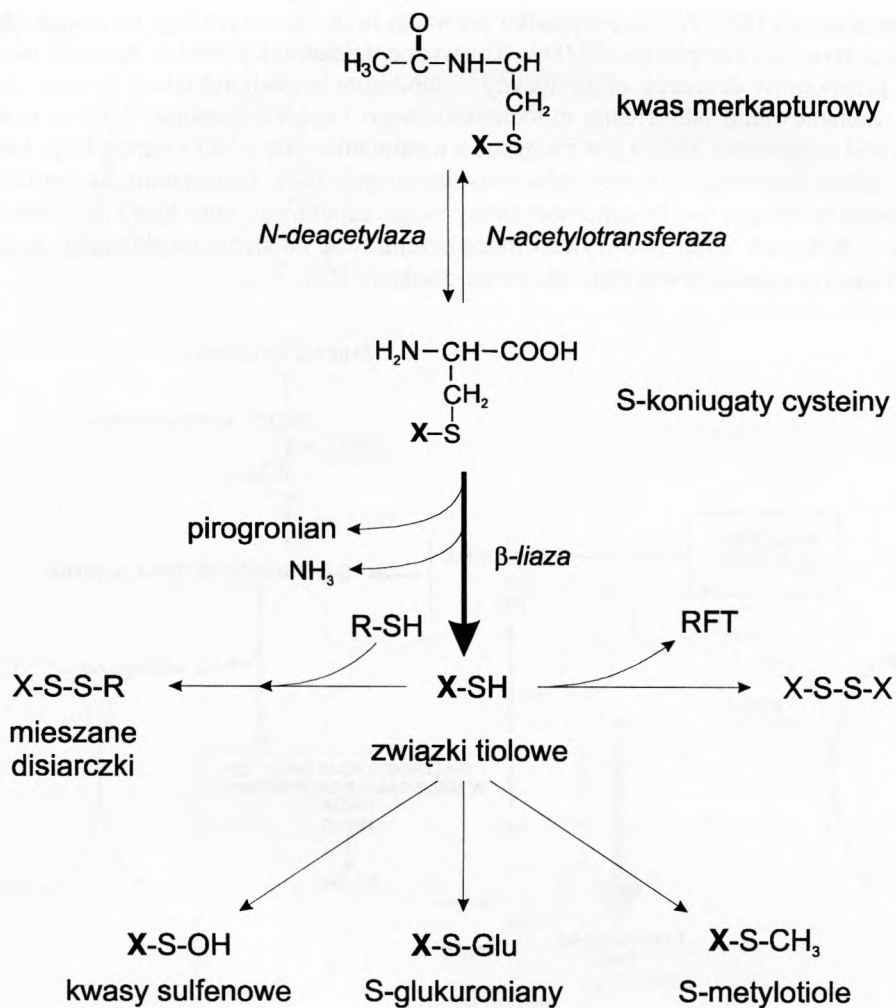
Ryc. 8. Przekształcanie 5-S-cysteinyldopaminy do pochodnych dihydrobenzotiazyny oraz możliwość powstawania z udziałem cysteiny licznych generujących RFT cykli redoksoowych (wg Zhanga i Dryhursta [37] zmodyfikowana)

disiarczkowych [42]. W tym przypadku prowadzi to do neuroprotekcji na skutek obniżenia aktywności receptorów NMDA. Toksyczne działanie CySNO w hodowli neuronów przypomina działanie oligomycyny – inhibitora mitochondrialnej syntazy ATP [43]. Zahamowanie oddychania mitochondrialnego i spadku poziomu ATP w neuronach pod wpływem CySNO jest związane z uwalnianiem się z NO i nitrozylacją kationów żelaza hemowego i białek żelazowo-siarkowych [44]. Zauważono, że neurotoksyczności nadmiaru S-nitrozohomocysteiny mogą zapobiegać inne tiole, np. cysteina, która w reakcjach S-transnitrozylacji może przejmować na siebie uwalniający się NO, a tym samym uniemożliwia jego toksyczne działanie [45].



Ryc. 9. Neuroprotekcjne i neurotoksyczne działanie S-nitrozocysteiny (wg Liptona i Stamlera [42] zmodyfikowana)

Detoksykacja elektrofilnych ksenobiotyków w organizmach zwierzęcych przebiega z udziałem S-transferazy glutationowej i prowadzi do powstania S-koniugatów glutationu (GSX) [46]. Dalsza biodegradacja GSX zachodzi w cyklu γ -glutamyliowym i ostatecznie prowadzi do S-koniugatów cysteiny, które w reakcji N-acetylacji przechodzą w nietoksyczne, wydalone następnie z moczem kwasy merkapturowe (p. rozdział 4). Okazuje się, że istnieje możliwość pojawiania się toksyczności, szczególnie niebezpiecznej dla nerek, związanej z niektórymi S-koniugatami cysteiny będącymi substratami β -liazy, enzymu występującego w nerkach [47, 48]. Pod wpływem tego enzymu może nastąpić w tioeterze cysteiny (Cy-S-X) rozbitcie wiązania pomiędzy atomem węgla i siarki z powstaniem pirogronianu, amoniaku i będących przyczyną nefrotoksyczności reaktywnych tioli (ryc. 10). We wszystkich przypadkach, kiedy pod



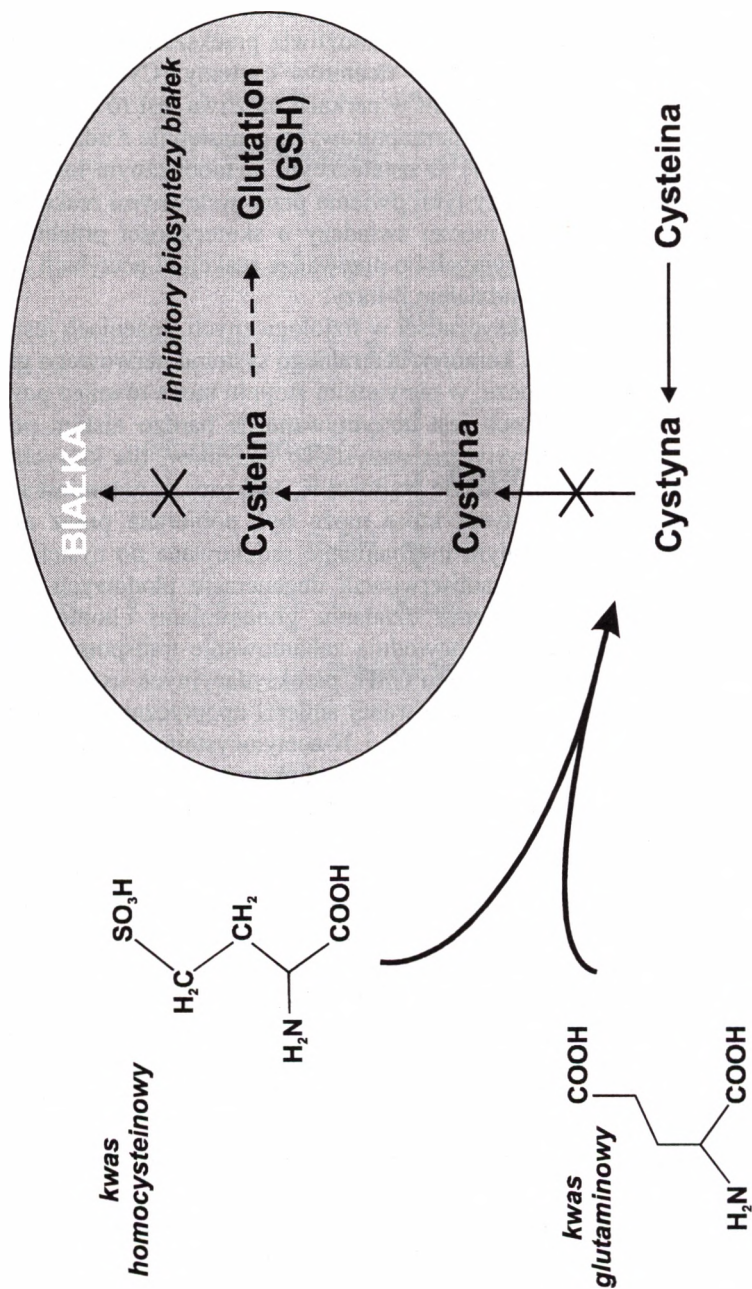
Ryc. 10. Udział β -liazy w nefrotoksyczności S-koniugatów cysteiny związanej z powstawaniem toksycznych tioli

wpływem Cy-S-X pojawia się nefrotoksyczność, to jest ona najczęściej związana z aktywnością β -liazy i uwalnianiem się toksycznych tioli [48, 49]. Na przykład, chloropuryna ulega reakcji koniugacji z GSH, do S-koniugatu cysteiny (Cy-S-X), który pod wpływem β -liazy jest przekształcany do tiolu – merkaptopuryny [50]. Powstawanie tioli zawsze niesie z sobą niebezpieczeństwo peroksydacyjnych uszkodzeń (p. rozdział 1), które będzie tym większe, im niższa jest wartość pK grupy $-\text{SH}$ uwalnianego tiolu. Również tiole o wysokich wartościach pK mogą w reakcjach S-oksydacji przechodzić w toksyczne kwasy sulfenowe, których reakcja z tiolami prowadzi do powstawania disiarczków. Zauważono, że robotnicy narażeni na trichloroetylen bardzo często zapa-

dali na nowotwory nerek, zlokalizowane najczęściej w kanalikach proksymalnych, czyli tam, gdzie mogą następować uszkodzenia związane z aktywnością β -liazy [51, 52]. Nerki ponadto posiadają aktywność N-deacetylazy, enzymu antagonistycznego w stosunku do N-acetylotransferazy [53], co umożliwia przekształcanie powstających w wątrobie merkapturanów na powrót do tioeterów cysteiny (Cys-S-X), będących substratami dla β -liazy [47, 48, 50]. Zatem w nerkach możliwa jest również regeneracja Cys-S-X z już powstałych kwasów merkapturowych, a następnie z udziałem β -liazy bioaktywacja do toksycznych tioli [54]. O ostatecznym metabolicznym losie Cys-S-X decyduje zatem równowaga pomiędzy tymi dwiema przeciwstawnymi reakcjami. Wysoka zawartość merkapturanów w moczu świadczy o skuteczności przebiegających w organizmie procesów detoksykacyjnych i o przewadze reakcji N-acetylacji nad reakcją β -eliminacji przebiegających z udziałem β -liazy.

Cysteina pomimo swej neurotoksyczności w fizjologicznych stężeniach jest komórkom bezwzględnie konieczna. Dla komórek centralnego systemu nerwowego głównym źródłem tego aminokwasu jest osocze, w niewielkim stopniu może również powstawać z metioniny. Cysteina w komórkach jest utrzymywana na bardzo niskim poziomie, w związku z tym cechą charakterystyczną wszystkich enzymów, dla których aminokwas ten jest substratem, są bardzo niskie wartości K_m . W osoczu natomiast zdecydowanie przeważa disiarczek – cystyna, która może być pobierana przez astrocyty, a następnie w nie do końca poznanym mechanizmie redukowana do cysteiny. Rotan i wsp. [55] w badaniach *in vitro* zaobserwowali degenerację płodowych neuronów korowych poddawanych długotrwałemu działaniu glutaminianu i homocysteinianu (ryc. 11). Związki te, jak stwierdzili, powodują zahamowanie transportu cystyny do komórek, co prowadzi do spadku poziomu GSH, peroksydacyjnych uszkodzeń i ostatecznie do apoptozy. Co ciekawe, obserwowanej śmierci apoptycznej komórek zapobiegają nie tylko antyoksydanty [witamina E i N-acetylocysteina (NAC)], ale także inhibitory biosyntezy białek – aktynomycyna i cykloheksimid. We wszystkich powyższych przypadkach obserwowane protekcyjne działanie znosi inhibitor biosyntezy GSH – butioninosulfoksymina (BSO). Oznacza to, że supresja biosyntezy białek w komórkach stanowi sposób „oszczędzania” cysteiny i kierowanie jej na szlak biosyntezy GSH. Wskazuje to, jak niezwykle ważną rolę w komórkach odgrywa GSH oraz jak istotną sprawą jest dostępność cysteiny dla jego syntezy [56]. Spostrzeżenie to wyjaśnia ponadto obserwowane już wcześniej przypadki hamowania biosyntezy białek w komórkach na skutek infekcji wirusowych czy w szoku temperaturowym [57, 58]. Pozwoliło również zrozumieć, dlaczego inhibitory biosyntezy białek mogą chronić przed promieniowaniem jonizującym [59]. Zjawiska hamowania biosyntezy białek pod wpływem czynników proapoptycznych były dotąd interpretowane jako jedna z oznak toksyczności. Tymczasem zahamowanie biosyntezy białek może w pewnych warunkach stać się endogennym mechanizmem obronnym opóźniającym śmierć w wyniku apoptozy.

Cysteina jako związek tiolowy w porównaniu z tiolowym tripeptydem glutationem jest nie tylko mniej skutecznym antyoksydantem, lecz równocześnie o wiele bardziej niebezpiecznym prooksydantem. Wprawdzie za antyoksydacyjnym działaniem cysteiny przemawia możliwość kompleksowego wiązania jonów metali, co oznacza ochronę przed niebezpieczną reakcją Fentona (p. rozdział 1). Cysteina może również jako związek tiolowy działać radioprotekcyjne [60] oraz chronić limfocyty przed aberracją chromosomów [61]. Jednak ze względu na swoją neurotoksyczność aminokwas ten



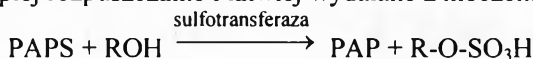
Ryc. 11. Hamujący wpływ kwasu glutaminowego i kwasu homocysteinowego na transport cystyny (wg Rotana i wsp. [55])

w żadnym wypadku nie może być stosowany jako lek. Również podawanie GSH w celach terapeutycznych jest znacznie ograniczone, ponieważ nie ulega on transportowi poprzez błony komórkowe [62]. Z tych powodów w celu podnoszenia poziomu GSH w komórkach zalecane jest stosowanie nietoksycznych prekursorów cysteiny, takich jak: N-acetylocysteina [63], kwas 2-oksotiazolidyno-4-karboksylowy [64] i tiazolidynowe pochodne [65]. Ze związków tych cysteina może być stopniowo uwalniana w komórkach w wyniku enzymatycznych lub nieenzymatycznych reakcji (p. rozdział 4).

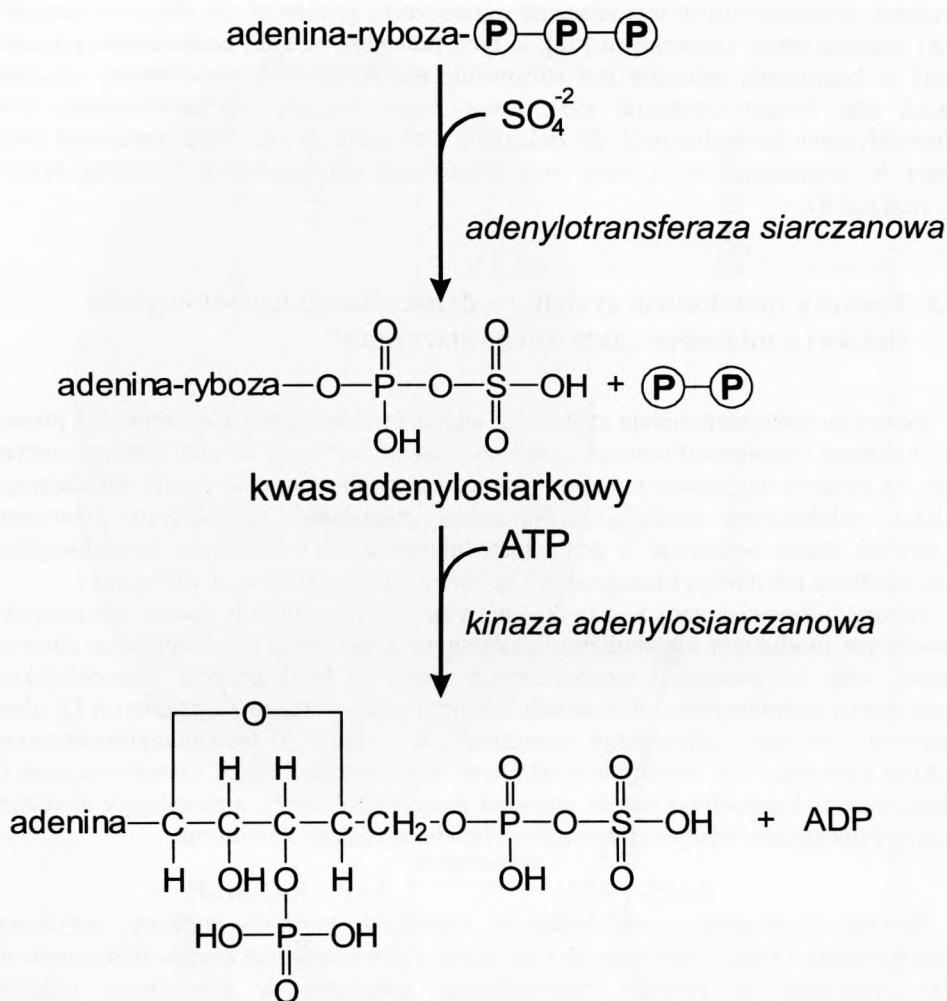
2.3. Tlenowy metabolizm cysteiny – detoksykacja ksenobiotyków (leków) z udziałem „aktywnego siarczanu”

Pierwsza reakcja utleniania cysteiny z udziałem dioksygenazy cysteinowej prowadzi do kwasu cysteinosulfinowego, przekształcanego następnie do siarczanów i tauryny (ryc. 5). Poziom siarczanów i tauryny w moczu pozwala ocenić natężenie utleniającego szlaku metabolizmu siarki [1]. Natomiast związkami wydalany z moczem, w których siarka występuje w postaci zredukowanej są S-koniugaty ksenobiotyków oraz produkty ich dalszej biodegradacji, tj. kwasy merkapturowe (p. rozdział 4).

Nieorganiczne siarczany należą do 4 najważniejszych anionów osocza i są nie tylko końcowym produktem metabolizmu wydalanym z moczem, lecz odgrywają również ważną rolę w procesach anabolicznych oraz w biodegradacji ksenobiotyków i niektórych endobiotyków. W tym celu nieorganiczny siarczan z udziałem ATP ulega aktywacji do tzw. „aktywnego siarczanu”, tj. kwasu 3'-fosfoadenylosiarkowego (PAPS) [66] (ryc. 12). Następnie z udziałem sulfotransferaz może następować estryfikacja różnych ksenobiotyków, na przykład paracetamolu [67], a powstające siarczany są mniej toksyczne, lepiej rozpuszczalne i łatwiej wydalone z moczem.



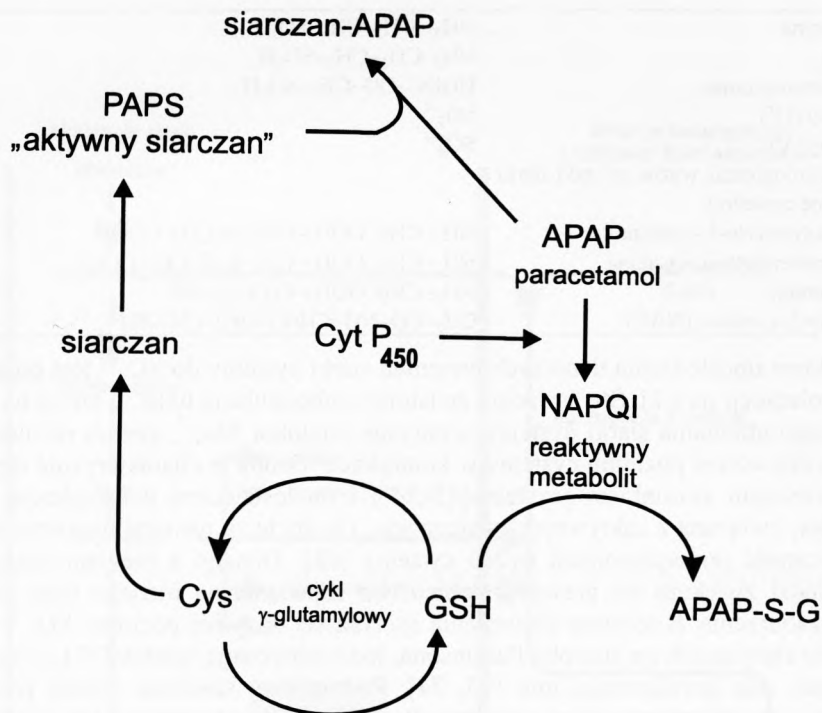
Również biodegradacja endobiotyków, takich jak: hormony tarczycy, sterydowy, katecholaminy i kwasy żółciowe, jest związana z powstawaniem estrów siarczanowych [68]. Siarczany są również bezwzględnie konieczne w biosyntezie glikozaminoglikanów, dawniej zwanych mukopolisacharydami, zawierających grupę siarczanową w postaci O-estrowej (R-O-SO_3^-) lub N-siarczanowej (R-NH-SO_3^-) (jak w heparynie i siarczanie heparanu). W centralnym systemie nerwowym reakcje sulfatacji odgrywają ważną rolę w biosyntezie siarczanów proteoglikanów biorących udział w interakcji komórek w rozwijającej się tkance nerwowej. Stwierdzono, że u pacjentów z chorobą Alzheimera zmienia się poziom siarczanu heparanu, występującego w okołonaczyniowej błonie podstawnej [69] oraz dochodzi do jego akumulacji w mózgu [70]. Ostatnio uzyskano dowody na istnienie specyficznego transportera siarczanów w mózgu ssaków [71].



Kwas 3'-fosfoadenylosiarkowy „aktywny siarczan”

Ryc. 12. Powstawanie „aktywnego siarczanu”

Biodegradacja paracetamolu to zarówno koniugacja powstającego „reaktywnego” metabolitu, p-benzochinono-iminy (NAPQI) z GSH, jak również powstawanie estrów siarczanowych tego leku (ryc. 13). Zatem z udziałem związków siarki mogą w komórkach przebiegać równoległe dwa mechanizmy detoksykacji, w pierwszym przypadku będą brały udział grupy $-\text{SH}$ reszty cysteiny, w drugim produkty ich utleniania – nieorganiczne siarczany [68] (ryc. 14).



Ryc. 13. Drogi detoksykacji paracetamolu (APAP)

Nazwy i wzory najważniejszych zarówno pod względem fizjologicznym, jak i farmakologicznym związków siarki zostały umieszczone w tab. 1.

Tabela 1

Najważniejsze fizjologiczne i farmakologiczne związki siarki

1. Aminokwasy siarkowe i produkty przemian

1.1. Tiole, etery i disiarczki

Metionina	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$
Homocysteina	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$
Cystationina	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH}_2$
Cysteina	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-SH}$
Cystyna	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH}_2$
Glutation	$\gamma\text{-glutamylcysteinyloglicyna (tripeptyd)}$
Cysteamina	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$
Cystamina	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$
Merkaptopirogronian	$\text{HOOC-CO-CH}_2\text{-SH}$

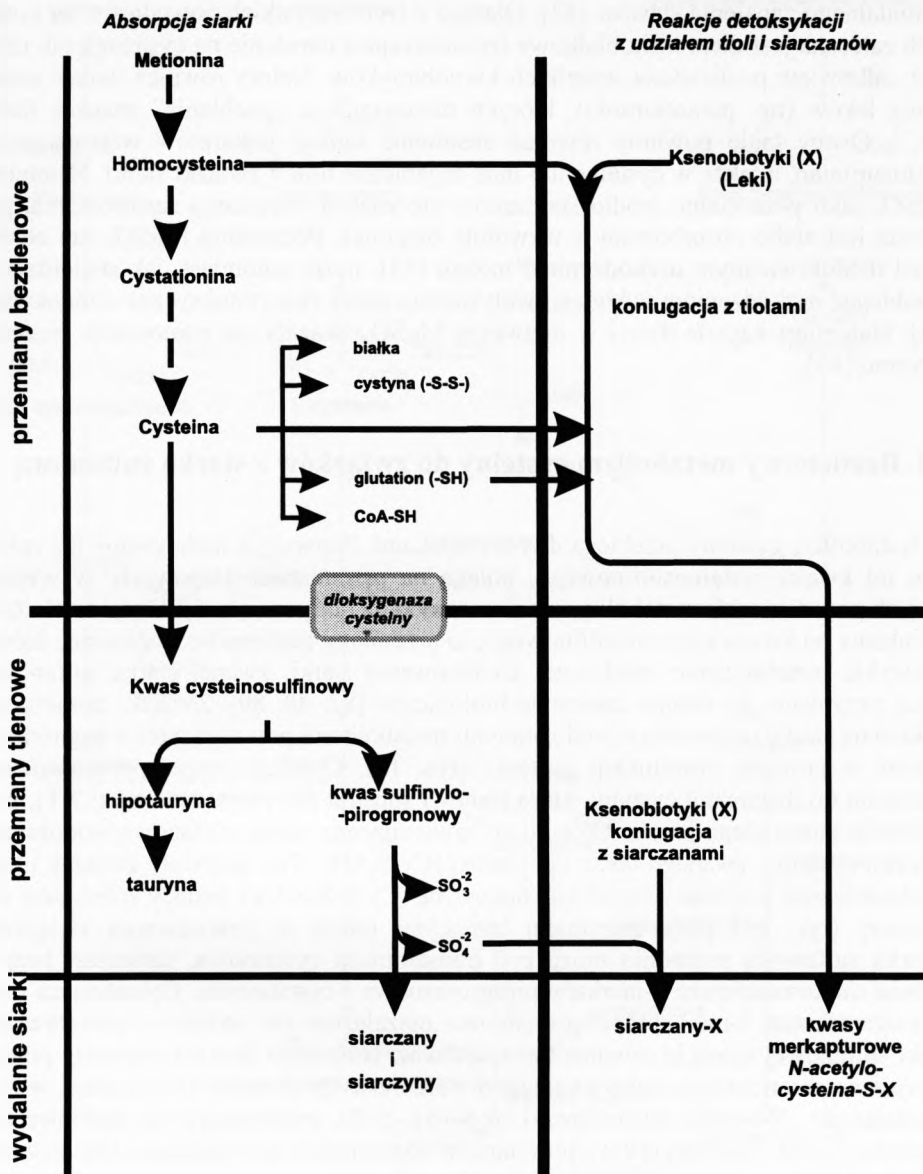
1.2. Sulfiny, sulfoniany i siarczany

Kwas cysteinosulfonowy	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{H}$
Kwas cysteinosulfonowy	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$

Hipotauryna	$\text{NH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--SO}_2\text{H}$
Tauryna	$\text{NH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--SO}_3\text{H}$
Sulfinylopirogonian	$\text{HOOC--CO--CH}_2\text{--SO}_2\text{H}$
Siarczany (IV)	SO_3^{-2}
Siarczany (VI)	SO_4^{-2}
2. Farmakologicznie ważne związki siarki	
(pochodne cysteiny)	
S-karboksymetylo-L-cysteina	$\text{NH}_2\text{--CH(COOH)--CH}_2\text{--S--CH}_2\text{--COOH}$
Karboksymetylotio-L-cysteina	$\text{NH}_2\text{--CH(COOH)--CH}_2\text{--S--S--CH}_2\text{--COOH}$
Penicylamina	$\text{NH}_2\text{--CH(COOH)--C(CH}_3)_2\text{--SH}$
N-acetylo-L-cysteina (NAC)	$\text{CH}_3\text{--CO--NH--CH(COOH)--CH}_2\text{--SH}$

Effektem upośledzenia tlenowych przemian siarki cysteiny do SO_4^{-2} jest pojawianie się nietolerancji na leki. Stwierdzono, że istnieje subpopulacja ludzi, u której na skutek wadliwego utleniania siarki cysteiny występuje niedobór SO_4^{-2} , czemu równocześnie towarzyszy wzrost poziomu cysteiny w komórkach. Osoby te charakteryzują się zatem podwyższonym stosunkiem $[\text{cysteina}]/[\text{SO}_4^{-2}]$ i niedostateczną detoksykacją ksenobiotyków, związaną z „aktywnym” siarczanem. Osoby te są również narażone na neurotoksyczność podwyższonych stężeń cysteiny [68]. Dlatego z biegiem czasu u tej grupy ludzi zwiększa się prawdopodobieństwo zapadania na różnego typu neurologiczne zaburzenia. Rozbieżne doniesienia spotyka się na temat poziomu SO_4^{-2} w osoczu osób cierpiących na chorobę Parkinsona, jedni obserwują spadek [72], czego równocześnie nie potwierdzają inni [73, 74]. Podniesiony stosunek wolnej [cysteiny]/ $[\text{SO}_4^{-2}]$ jest obserwowany w chorobie Parkinsona, w chorobie Alzheimera [72], w autyzmie [75, 76] oraz w zaburzeniach immunologicznych [77, 78]. Testem pozwalającym na stwierdzenie defektu metabolicznego związanego z niedoborem SO_4^{-2} jest obniżenie powstawania siarczanu paracetamolu w stosunku do glukuronidyzacji tego leku. Na przykład, w moczu dzieci autystycznych po podaniu paracetamolu stwierdza się obniżony stosunek stężeń siarczanu paracetamolu w stosunku do glukuronianu paracetamolu [75, 76]. Takie przesunięcie w kierunku wzmożonej glukuronidyzacji może w konsekwencji prowadzić do zmian w farmakokinetyce i farmakodynamice różnych leków.

Effekty neurotoksycznego działania zarówno podwyższonego poziomu cysteiny, jak i niedoboru SO_4^{-2} będą dodatkowo wzrastać w sytuacji, kiedy organizm będzie narażony na synergistyczne działanie różnych egzogennych toksyn, w tym także leków. Dlatego wszelkie ksenobiotyki, leki, konserwanty, sztuczne barwniki czy związki pochodzące z zanieczyszczenia środowiska stanowią szczególnie duże zagrożenie dla subpopulacji ludzi z niedoborem siarczanów. Niebezpieczne w tym przypadku będzie również podawanie salicylanów, które dodatkowo stymulują nerkowe wydalanie siarczanów, czym jeszcze bardziej pogłębiają ich niedobór w organizmie [79]. Dla tej grupy osób potencjalnie niebezpieczne może być również podawanie leków będących prekursorami cysteiny, jak np. N-acetylocysteiny, pomimo ich udokumentowanego neuroprotektynowego [80] i immunostymulującego działania [81].



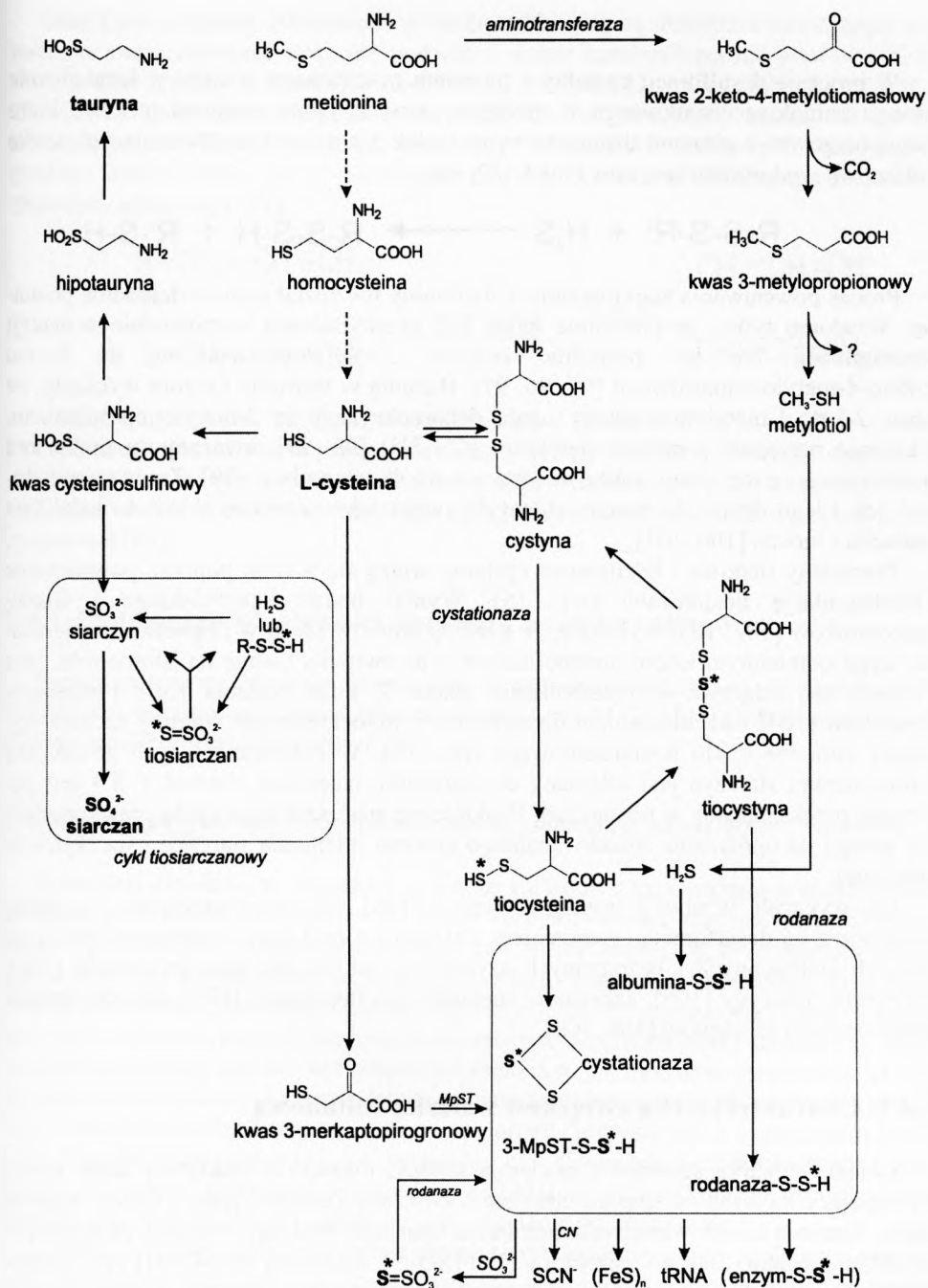
Ryc. 14. Reakcje detoksykacji z udziałem grup hydrosulfidowych (–SH) reszt cysteiny oraz produktów ich utleniania – siarczanów

Niedobór siarczanów to również upośledzony metabolizm endobiotyków, jak: sterydy, kwasy żółciowe, catecholaminy. Upośledzone powstawanie siarczanów kwasów żółciowych prowadzi do marskości wątroby [82], a glikozyloaminoglikanów do reumatoidalnego zapalenia stawów [83]. Dlatego z tych wszystkich powodów u tej grupy osób zalecana jest dieta niskobiałkowa (zmniejszająca narażenie na cysteinę), jak również całkowicie pozbawiona wszelkich ksenobiotyków. Należy również unikać podawania leków (np. paracetamolu), których biodegradacja „pochłania” znaczne ilości SO_4^{2-} . Osoby takie powinny również absolutnie unikać pokarmów wzbogacanych w glutaminian, a także w cysteinę lub inne organiczne tiole i związki siarki. Natomiast MgSO_4 jako potencjalne źródło siarczanów nie znalazł większego zastosowania, ponieważ jest słabo absorbowany i wywołuje biegunki. Podawanie MgSO_4 nie chroni przed niedokrwinnym uszkodzeniem mózgu [84], może natomiast, jak stwierdzono, zapobiegać uszkodzeniom mózgu wywoływanym przez ekscytotoksyczne aminokwasy [85]. Natomiast kąpiele dzieci w roztworze MgSO_4 okazały się pomocne w leczeniu autyzmu [86].

2.4. Beztlenowy metabolizm cysteiny do związków z siarką sulfanową

Katabolizm cysteiny przebiega dwoma szlakami. Pierwszy z nich, zwany też zależnym od kwasu cysteinosulfinowego, polega na przemianach tlenowych, w wyniku których powstają takie metabolity, jak siarczany oraz tauryna (ryc. 5). Drugi szlak, tzw. niezależny od kwasu cysteinosulfinowego, to przemiany beztlenowe stanowiące źródło niezwykle metabolicznie reaktywnej zredukowanej siarki, zwanej siarką sulfanową, której przypisuje się istotne znaczenie biologiczne [87, 88, 89]. Związki zawierające reaktywną siarkę sulfanową są endogennymi metabolitami powstającymi w komórkach ssaków w procesie desulfuracji cysteiny (ryc. 15). Cysteina ulega spontanicznemu utlenieniu do disiarczku cystyny, która stanowi substrat dla γ -cystationazy (CST), pod wpływem której ulega przekształceniu do zawierającego siarkę sulfanową wodoronadsiarczku cysteiny, zwanego także tiocysteiną (Cy-S-SH). Ten nietrwały związek ulega przekształceniu w stabilny trisiarczek tiocystynę (Cy-S-S-S-Cy), będący substratem dla rodanazy (ryc. 15) [90]. Enzymami biorącymi udział w powstawaniu związków z siarką sulfanową pośrednio może być transaminaza cysteinowa, natomiast bezpośrednio siarkotransferaza 3-merkaptopirogronianowa i cystationaza. Cystationaza oraz siarkotransferaza 3-merkaptopirogronianowa niezależnie od udziału w powstawaniu siarki sulfanowej mogą ją również transportować. Natomiast funkcja rodanazy polega głównie na przenoszeniu reaktywnej siarki z anionowych donorów (tiosiarczan, wodoronadsiarczki (R-S-SH), wielosiarczki ($\text{R-S(S)}_n\text{-S-R}$), politioniany) na tiofilowe akceptory (cyjanek, siarczany (IV)) z powstaniem odpowiednio tiocyjanianu i tiosiarczanu, a także na białka żelazowo-siarkowe (ryc. 15).

Do białek transportujących siarkę sulfanową w postaci nadsiarczków należą także albuminy osocza [91, 92]. O ważnej roli albuminy w tym względzie świadczy fakt obecności siarki sulfanowej w sercu i śledzionie, a więc w narządach, w których aktywność enzymów związanych z biosyntezą siarki sulfanowej jest znikoma [93]. Oznacza to, że albumina osocza może być w krwiobiegu specyficznym nośnikiem siarki sulfanowej z wątroby i nerek do innych narządów.



Ryc. 15. Beztlenowe przemiany cysteiny do związków z siarką sulfanową (wg Tooheya [87] oraz Kojima i wsp. [104] zmodyfikowana)

W procesie desulfuracji cysteiny z udziałem cystationazy, a także w katabolizmie innego aminokwasu siarkowego, tj. metioniny, powstają jony wodorosiarczkowe, które mogą reagować z grupami disiarczkowymi białek z powstaniem zawierających siarkę sulfanową wodoronadsiarczkwów białek [87, 94].



Proces powstawania siarkowodoru z metioniny nie został jeszcze dokładnie poznany. Wiadomo tylko, że metionina może być przekształcana bezpośrednio w reakcji transaminacji lub też pośrednio poprzez 5'-metylotioadenozynę do kwasu 2-keto-4-metylotiomasłowego [95, 96, 97]. Badania w wątrobie szczura wykazały, że kwas 2-keto-4-metylotiomasłowy ulega dekarboksylacji do 3-metylotiopropionianu, z którego następnie powstaje metylotiol (CH_3SH) [98, 99], uważany za prekursora powstającego z metioniny siarkowodoru w komórkach ssaków [99]. Zarówno metylotiol, jak i jego disiarczki zostały zidentyfikowane jako naturalne składniki ludzkiego oddechu i moczu [100, 101].

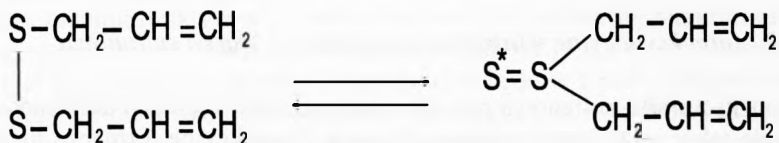
Przemiany tlenowe i beztlenowe cysteiny wiążą się z sobą poprzez powstawanie i biodegradację tiosiarczanu (ryc. 15). Wyniki badań Skarżyńskiego i współpracowników [102, 103] wykazały, że każdy z atomów siarki w cząsteczce tiosiarczanu ulega odmiennym losom metabolicznym oraz zwróciły uwagę na istotną rolę, jaką związek ten odgrywa w metabolizmie siarki. Z kolei badania Koja i współpracowników [104] nad utlenianiem tiosiarczanu w mitochondriach wątroby szczura wykazały istnienie cyklu tiosiarczanowego (ryc. 15). W przemianach tych powstający z tiosiarczanu siarczyny jest utleniany do siarczanu, natomiast siarczki ($-\text{S}^-$) jest ponownie przekształcany w tiosiarczan. Biologiczne znaczenie tego cyklu prawdopodobnie polega na opóźnieniu nieodwracalnego procesu utleniania siarczku i siarczyny do siarczanu.

Jak wykazali Wróbel i współpracownicy [105], natężenie przemian L-cysteiny związane z jej desulfuracją i tworzeniem związków z puli siarki sulfanowej zależy od różnych endogennych i egzogennych czynników, takich jak: płeć zwierzęcia [105], aktywność tarczycy [106], aktywność metabolizmu tlenowego [107] oraz dostępność odpowiednich substratów [108, 109].

2.4.1. Charakterystyka związków z siarką sulfanową

Związki z siarką sulfanową zawierają labilny, niezwykle reaktywny atom siarki, występujący na 0 lub -1 stopniu utlenienia, związany kowalencyjnie z innym atomem siarki. Siarka o takich właściwościach łatwo opuszcza strukturę związku, przechodząc na różne akceptory, jak np.: siarczany (IV) (SO_3^{2-}), sulfiniany ($\text{R-SO}_2\text{-H}$) czy cyjanek (CN^-). Ze względu na ten ostatni akceptor bywa też często nazywana siarką cyjanolizującą. Przykładami związków z fizjologicznej puli siarki sulfanowej są: nadsiarczki (R-S-S-H), wielosiarczki ($\text{R-S}_n\text{-R}$, gdzie $n \geq 3$) oraz politioniany ($^-\text{O}_3\text{S-S}_n\text{-SO}_3^-$). Właściwości siarki sulfanowej posiada również zewnętrzny atom siarki tiosiarczanu ($\text{S}=\text{SO}_3^{2-}$), a także siarka elementarna (S_8) [87, 88, 89, 93].

Inną klasą połączeń związanych z siarką sulfanową są disiarczki zawierające ponadto w swej cząsteczce wiązanie podwójne, grupę karbonylową lub enolową ($R-S-S-CH_2-CH=CH-R$; $R-S-S-CH_2-CO-CO_2H$ i $R-S-S-CH_2-COH$ lub $R-S-S-CH_2-CH=CH-OH$), co umożliwia tautomeryzację do zawierających siarkę sulfanową tiosulfoksydów. Tiosulfoksydowe tautomery disiarczków allilowych mogą być źródłem labilnej siarki, jak to ma miejsce np. w przypadku pochodzącego z czosnku disiarczku allilowego [87].



Podobny mechanizm zachodzi w disiarczках z grupą karbonylową lub enolową, których obecność, tak jak w przypadku nienasyconego rodnika allilowego, umożliwia „labilizację” sąsiadujących wiązań C-S i promuje tautomeryzację disiarczków do tiosulfoksydów. Na tej drodze związki tego typu stają się istotnym źródłem labilnej siarki sulfanowej [87].

2.4.2. Biologiczne właściwości związków z siarką sulfanową

Siarka sulfanowa odgrywa istotną rolę w procesie detoksykacji cyjanków [110, 111] oraz w powstawaniu białek żelazowo-siarkowych [112, 113], a także może pełnić funkcję regulatorową w komórkach [87].

2.4.2.1. Regulacyjny wpływ związków z siarką sulfanową na aktywność enzymów

Właściwości regulacyjne związków z siarką sulfanową są związane z możliwością kowalencyjnej modyfikacji grup $-SH$ białek receptorowych i enzymatycznych, związanej z powstaniem wodoronadsiarczków lub trisiarczków, co bezpośrednio może wpływać na ich aktywność biologiczną [87]. Zatem z udziałem transferaz siarkowych i siarki sulfanowej może dochodzić do aktywacji jednych, a inaktywacji innych enzymów. Do enzymów, których aktywność wzrasta pod wpływem siarki sulfanowej, należą oksydoreduktazy zawierające żelazo lub molibden, jak oksydaza ksantynowa [114], oksydaza aldehydowa [115] oraz dehydrogenaza maleinianowa [116]. Również syntetaza 5-aminolewulinianowa jest aktywowana przez cystynę wraz z cystationazą [117, 118]. Ponadto takie disiarczki, jak cystamina czy disiarczek 2-merkaptioetanolu, stymulują aktywność fruktozo-1,6-bisfosfatazy [119]. W przypadku tego ostatniego disiarczku dla labilizacji siarki konieczne jest utlenienie do dialdehydu.

Związki z siarką sulfanową mogą również wywierać hamujący wpływ na aktywność niektórych enzymów, jak zaobserwowano w przypadku dehydratazy serynowej [120, 121]. Do zahamowania aktywności tego enzymu dochodzi podczas inkubacji z cystyną i cystationazą lub z elementarną siarką. Do enzymów inaktywowanych przez siarkę sulfanową należą także: kinaza adenylanowa [122, 123], aminotransferaza tyrozynowa [124], dekarboksylaza ornitynowa [125]. Inhibicja tych enzymów następuje

poprzez tworzenie wodoronadsiarczków i jest odwracalna pod wpływem działania tioli (np. GSH lub ditiotreitolu) [87].

Co ciekawe, zarówno hamowanie, jak i aktywacja enzymów *in vitro* przez systemy mogące wytwarzać i transportować siarkę sulfanową następują przy jej bardzo niskim i wąskim zakresie stężeń [87, 91]. Zatem udział związków z siarką sulfanową umożliwia kolejny mechanizm kowalencyjnej modyfikacji grup –SH, będący alternatywnym w stosunku do reakcji S-tiolacji czy S-nitrozylacji (p. rozdział 9).

2.4.2.2. Antyoksydacyjne właściwości związków z siarką sulfanową

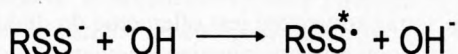
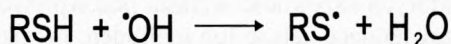
Związki z siarką sulfanową nie tylko biorą udział w regulacji aktywności białek, ale wykazują także właściwości antyoksydacyjne i protekcyjne. Oznacza to, że mogą zarówno „zmiatać” wolne rodniki [126], jak i podnosić aktywność takich enzymów antyoksydacyjnych, jak: peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa czy dysmutaza ponadtlenkowa [126, 127, 128].

Nadsiarczki mogą zmiatać wolne rodniki zarówno poprzez transfer atomu wodoru, jak i elektronu, zależnie od natury wolnych rodników [129, 130]. W fizjologicznym pH równowaga kwasowo-zasadowa reakcji dysocjacji wodoronadsiarczków jest przesunięta w kierunku anionu nadsiarczkowego.



Wodoronadsiarczki (RSSH), w porównaniu z grupą sulfhydrylową (–SH), są bardziej skutecznymi donorami wodoru, a jako aniony nadsiarczkowe (RSS[–]) donorami elektronów, co czyni je niezwykle skutecznymi antyoksydantami.

Tiole zmiatają niezwykle niebezpieczne rodniki hydroksylowe ([•]OH) z powstaniem rodników tiolowych (RS[•]), podczas gdy wodoronadsiarczki (RSSH) i aniony nadtiolanowe (RSS[–]) z utworzeniem rodników nadtiolowych (RSS[•]). Te ostatnie (RSS[•]) są bardziej stabilne i w rezultacie mniej reaktywne, a w konsekwencji mniej toksyczne niż rodniki tiolowe (RS[•]) [130].



Występujący w ekstraktach czosnku disiarczki allilu hamuje peroksydację lipidów [126]. Wszystko to razem pozwala uważać związki z reaktywną siarką sulfanową za jeden z ważnych elementów obrony antyoksydacyjnej komórek [129].

2.4.2.3. Związki z siarką sulfanową w procesach nowotworowych

Cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest całkowity brak aktywności γ -cystationazy, natomiast aktywności aminotransferazy cysteinowej, siarkotransferazy 3-merkaptopirogronianowej i rodanazy są zaledwie śladowe [131]. Konsekwencją tego jest brak w tych komórkach biosyntezy i transportu związków z puli siarki sulfanowej. Toohey sugeruje, że niekontrolowana proliferacja komórek nowotworowych jest właśnie następstwem niedoboru siarki sulfanowej i nadmiernej aktywności tych enzymów, które w prawidłowych komórkach byłyby inaktywowane przez tę reaktywną formę siarki [87]. Potwierdzeniem tego jest remisja transplantowanych nowotworów u myszy [132, 133] oraz zahamowanie indukcji nowotworów przez kancerogeny pod wpływem różnych prekursorów siarki sulfanowej [134, 135].

Obecnie coraz częściej pojawiają się doniesienia o korzystnym antyproliferacyjnym działaniu związków z siarką sulfanową lub ich prekursorów na komórki nowotworowe. Obecny w ekstraktach czosnku disiarczki allilu, stanowiący około 60% siarki obecnej w oleju otrzymanym z bulwy tej rośliny, hamuje rozwój nowotworów u zwierząt i zmniejsza uszkodzenia spowodowane naświetlaniem promieniami gamma [136, 137, 138, 139]. Ponadto badania epidemiologiczne wskazują, że dieta bogata w czosnek znacznie obniża ryzyko zachorowań na nowotwory [140, 141]. Disiarczki allilu efektywnie hamuje *in vitro* proliferację wielu komórek nowotworowych [142, 143, 144, 145].

Z drugiej jednak strony stwierdzono, że proliferacja *in vitro* złośliwych komórek limfoidalnych jest całkowicie zależna od obecności siarki sulfanowej i komórki te, aby móc normalnie proliferować, wymagają dostarczenia źródeł tej siarki. Stymulujący efekt siarki sulfanowej zaobserwowano także w przypadku normalnych komórek szpiku kostnego [89].

Wszelkie próby indukowania aktywności enzymów związanych z powstawaniem siarki sulfanowej poprzez podawanie odpowiednich substratów w komórkach nowotworowych nie powiodły się [146]. Dlatego dalsze badania powinny się raczej koncentrować na próbach bezpośredniego wprowadzania do komórek nowotworowych odpowiednich systemów generujących siarkę sulfanową.

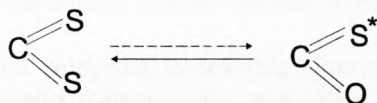
Równocześnie stwierdzono, że w wątrobach myszy obarczonych nowotworem raka wąsików Ehrlicha (EATC) aktywność MPST, jak i CST jest znacznie obniżona w porównaniu z wątrobami zwierząt zdrowych [146]. Oznacza to, że konsekwencją rozwijającego się nowotworu jest drastyczny spadek w wątrobie aktywności enzymów związanych z wytwarzaniem siarki sulfanowej. Stwierdzono także, że będące prekursorami cysteiny pochodne tiazolidynowe, takie jak kwas 2-metylotiazolidyno-2,4-dikarboksylowy, podnoszą aktywność MPST i CST w wątrobach myszy z nowotworem o wiele skuteczniej niż aminokwasy siarkowe (cysteina, metionina) [146]. Sugeruje to, że istnieje możliwość korygowania zaburzonego metabolizmu związanego z wytwarzaniem siarki sulfanowej w wątrobie zwierząt obarczonych nowotworem.

Interesująca jest również możliwość modulowania poziomu grup –SH, jak również aktywności enzymów związanych z beztlenowymi przemianami cysteiny przez donory NO oraz inhibitory syntazy NO [147].

2.4.2.4. Inne biologiczne właściwości związków z siarką sulfanową

Siarka sulfanowa bierze także udział w procesie sulfuracji tRNA, co stanowi po-transkrypcyjną modyfikację tRNA. Stwierdzono, że atom siarki jest przenoszony na tRNA z udziałem MPST z 3-merkaptopirogronianu – produktu transaminacji cysteiny [87, 148, 149, 150]. Merkaptopirogronian wprawdzie nie posiada siarki sulfanowej w jej klasycznej definicji, jednak obecność grupy karbonylowej znacznie zwiększa jej reaktywność w porównaniu z siarką cysteiny. Nie można również w tym przypadku wykluczyć utlenienia do odpowiedniego disiarczku i tautomeryzacji do tiosulfoksydu. Tiopirymidyny i metylotiopuryny są normalnymi składnikami tRNA i odgrywają ważną rolę w procesie translacji. Tak więc, można powiedzieć, że beztlenowe przemiany cysteiny dostarczają związków z siarką sulfanową, niezbędnych dla procesu potranskrypcyjnej modyfikacji tRNA.

Wykazano również wpływ związków z siarką sulfanową na aktywność komórek związanych z systemem odpornościowym organizmu [87, 89]. W hodowli komórek układu immunologicznego *in vitro*, ze względu na możliwość znacznej stymulacji proliferacji, od dawna powszechnie stosowany jest 2-merkptoetanol lub 1-tioglicerol. Może to być następstwo redukcyjnych właściwości tych tioli, ale może także wynikać z faktu, iż związki te *in situ* mogą być przekształcane do disiarczku z grupami karbonylowymi, co umożliwia ich tautomeryzację do związków zawierających siarkę sulfanową. Stosowany w leczeniu AIDS immunotiol (dietyloditiokarbaminian) podnosi *in vivo* odporność organizmu u ludzi i myszy [151, 152, 153]. Związek ten metabolizowany jest do disiarczku węgla, który następnie ulega przekształceniu do związku zawierającego reaktywną siarkę.



Zawierający siarkę sulfanową trisiarczek – tiocystyna (Cys-S-S-S-Cys) oraz elementarna siarka (S_8) katalizują nieenzymatyczną redukcję cytochromu c przez glutatien (GSH) [154, 155].

Ostatnio zaobserwowano również znamienne obniżenie poziomu siarki sulfanowej w osoczu pacjentów z chroniczną niewydolnością nerek, a proces hemodializy dodatkowo obniżał jej poziom w porównaniu z osoczem osób zdrowych [156].

W chwili obecnej niewyjaśnione pozostają zależności pomiędzy obecnością w mózgach ssaków bogatych w siarkę ziarnistości a przemianami związanymi z siarką sulfanową [157].

2.4.2.5. Systemy generujące siarkę sulfanową

Trudnością, na którą zwraca uwagę Toohey jest fakt, że związki zawierające siarkę sulfanową nie mogą być stosowane w większości systemów biologicznych, ponieważ w fizjologicznym pH są szybko rozkładane i „nie mają czasu” stać się efektywne [87]. Dlatego autor ten proponuje różnego typu systemy generujące siarkę sulfanową, jak wspomniane wyżej disiarczki z grupą allilową, karbonylową lub enolową [87, 91, 93]. Jednym z takich systemów może być fosforan pirydoksalu i cystyna. Pirydoksal katalizuje nieenzymatyczną reakcję β -eliminacji cystyny, w wyniku której powstaje m.in. wodoronadsiarcezek cysteiny zawierający siarkę sulfanową (R-S-S*-H) [87, 93]. Innym systemem generującym siarkę sulfanową w hodowli komórkowej może być cystamina, której utlenienie przez obecną w surowicy oksydazę diaminową prowadzi do powstania aldehydu, którego izomer zawiera siarkę sulfanową [87]. Również disiarczki 2-merkaptioetanolu, będący substratem dla dehydrogenaz alkoholowych, ulega przekształceniu w disiarczki aldehydowy, którego odpowiedni izomer zawiera siarkę sulfanową [91, 92, 158]. Stabilnym i nietoksycznym źródłem siarki sulfanowej mogą być także traktowane siarczkami białka (np. nadsiarczki albuminy osocza lub nadsiarczki globuliny jaja kurzego) [89, 91, 92, 94, 96]. Z drugiej jednak strony, systemy generujące siarkę sulfanową podane w stężeniach większych od optymalnych mogą stać się toksyczne i przyczynić się do tworzenia tzw. gigantycznych komórek [87, 91].

Podsumowując, siarka sulfanowa powstaje w toku znanych szlaków metabolicznych (ryc. 15), a białka nośnikowe, które ją stabilizują i transportują, są szeroko rozpowszechnione. Związki z siarką sulfanową skutecznie regulują *in vitro* aktywność wielu enzymów, a także wykazują właściwości antyoksydacyjne. Ponadto istnieje związek pomiędzy zaburzonym beztlenowym metabolizmem siarki a procesami nowotworami i infekcjami wirusowymi oraz niedoborami immunologicznymi. Wszystko to razem sugeruje, że siarka sulfanowa poprzez kowalencyjne modyfikacje grup -SH może spełniać w komórkach naturalne funkcje regulacyjne, a jej wysoki potencjał aktywności i krótki okres półtrwania nadają jej cechy regulatora o dużej precyzji działania.

2.4.3. Metody oznaczania siarki sulfanowej

Dla pełnego poznania biologicznej roli związków z siarką sulfanową konieczne jest dysponowanie odpowiednio czułymi metodami oznaczania jej poziomu w materiale biologicznym. Jak już wspomniano, związki z siarką sulfanową łatwo reagują z cyjankiem z powstaniem tiocyjanianu (rodanku), który reaguje z jonami żelaza Fe^{3+} , dając czerwony kompleks. Reakcja ta stanowi podstawę najpopularniejszej spektrofotometrycznej metody oznaczania poziomu siarki sulfanowej, po raz pierwszy opisanej przez Wooda [89]. Niestety, metoda ta i jej modyfikacje odznaczają się ograniczoną czułością i specyficznością i z tego względu nie nadają się do oznaczania śladowych ilości siarki sulfanowej w materiale biologicznym.

Dlatego też w ostatnich latach trwają poszukiwania nowych metod umożliwiających precyzyjne oznaczanie zredukowanej siarki sulfanowej. Sörbo i współpracownicy opisali metodę chromatografii gazowej do oznaczania siarki sulfanowej związanej z białkami [159]. Metoda ta, jakkolwiek dosyć precyzyjna, nie pozwala oznaczać nie-

białkowych form siarki sulfanowej. Westley i Westley z kolei opracowali metodę z użyciem polarografii, polegającą na przekształceniu siarki sulfanowej (nazywanej przez nich siarką reagującą z cyjankiem) do tiocyjanianu przy użyciu rodanazy jako katalizatora, cyjanku jako akceptora oraz glutationu jako kofaktora [88, 89]. Metoda ta jest czulsza od metody kolorymetrycznej, jednakże jest dosyć pracochłonna i uciążliwa ze względu na skomplikowany system detekcji.



Poszukując nowych metod oznaczania związków z siarką sulfanową, Ogasawara i współpracownicy odkryli, że siarka sulfanowa związana z normalną ludzką surowicą może być uwalniana jako siarczek przez redukcję ditiotreitolem [113, 160]. Uwolniony siarczek może być przekształcony w reakcji z p-fenylenodiaminą i jonami żelaza Fe^{3+} we fluoryzującą pochodną – tioninę, którą można oznaczać fluorymetrycznie przez HPLC w kombinacji z dializą gazową [161, 162]. Siarkę uwolnioną przez redukcję ditiotreitolem Ogasawara nazwał „siarką związaną” (*bound sulfur*). Metoda ta odznacza się wysoką czułością i specyficznością, jednak za jej pomocą nie mogą być oznaczane zawierające siarkę sulfanową tiosulfoniany i tiosiarczany, ponieważ nie ulegają one redukcji ditiotreitolem [160]. „Siarka związana” (*bound sulfur*) stanowi więc, według Ogasawary, pewną frakcję siarki sulfanowej. Autor ten wprowadził także pojęcie „kwaśnej-labilnej siarki” dla określenia siarki uwolnionej w formie H_2S z białek żelazowo-siarkowych pod wpływem kwasu solnego. Ten rodzaj siarki był zlokalizowany głównie we frakcji mitochondrialnej, w przeciwieństwie do „siarki związanej” znalezionej we frakcjach cytozolowych [95]. Te obserwacje są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami o lokalizacji klasterów żelazowo-siarkowych we frakcjach mitochondrialnych [163].

Wykorzystując właściwość uwalniania siarki sulfanowej w postaci siarczku poprzez redukcję ditiotreitolem, Toohey oznaczał poziom siarki sulfanowej metodą dyfuzyjną [164]. Uwolniony siarczek dyfunduje w postaci H_2S w szczelnie zamkniętym naczynku dyfuzyjnym i jest wychwytywany przez znajdujący się w sąsiedniej komorze kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB). Tworzący się żółty produkt reakcji jest oznaczany spektrofotometrycznie.

Każda z metod oznaczania siarki sulfanowej dotyczy innego rodzaju związków zawierających tę reaktywną formę siarki. Pojęcie „siarka sulfanowa” odnosi się do całej puli związków zawierających zredukowany atom siarki związany kowalencyjnie z innym atomem siarki, natomiast określenia „siarka związana z białkami”, „siarka związana – uwalniana przez redukcję ditiotreitolem” (*bound sulfur*) oraz „kwaśna-labilna siarka” odnoszą się do poszczególnych klas związków z siarką sulfanową i nie należy używać tych pojęć zamiennie.

Literatura

- [1] Cooper A.J.L. (1983), *Biochemistry of sulfur containing amino acids*. Ann. Rev. Biochem., 52, 187–222.
- [2] Hell R. (1997), *Molecular physiology of plant sulfur metabolism*. Planta, 202, 138–148.
- [3] Saito K. (2000), *Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino-acid*. Curr. Opin. Plant. Biol., 3, 188–195.
- [4] Gaitonde M.K. (1967), *A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid*. Biochem. J., 104, 627–633.
- [5] Puka Sundvall M., Eriksson P., Nilsson M., Saudberg M., Lehmann A. (1995), *Neurotoxicity of cysteine: interaction with glutamate*. Brain Res., 705, 65–70.
- [6] Janaky R., Varga V., Hermann A., Saransari P., Oja S.S. (2000), *Mechanism of L-cysteine neurotoxicity*. Neurochem. Res., 25, 1397–1405.
- [7] Madison D.V., Malenka R.C., Nicoll R.A. (1991), *Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission*. Annu. Rev. Neurosci., 14, 379–397.
- [8] Balázs R. (1988), *Metabolic imbalance and nerve cell damage in the brain*. Prog. Brain Res., 73, 447–461.
- [9] Choi D.W., Rothman S.M. (1990), *The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death*. Annu. Rev. Neurosci., 13, 171–181.
- [10] Jesberger J.A., Richardson J.S. (1991), *Oxygen free radicals and brain dysfunction*. Int. J. Neurosci., 57, 1–17.
- [11] Rothman S.M., Olney J.W. (1987), *Excitotoxicity and the NMDA receptor*. Trends. Neurosci., 10, 299–302.
- [12] Choi D.W. (1988), *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system*. Neuron, 1, 623–634.
- [13] Garthwaite J., Charles S.L., Chess W.R. (1988), *Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain*. Nature, 336, 385–388.
- [14] Lipton S.A., Stamler J.S. (1994), *Actions of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor*. Neuropharmacology, 33, 1229–1233.
- [15] Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H. (1990), *Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide*. Nature, 347, 768–770.
- [16] Olney J.W., Zorumski C., Price M.T., Labruyere J. (1990), *L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin*. Science, 248, 596–599.
- [17] Ferkany J., Coyle J.T. (1986), *Heterogeneity of sodium dependent excitatory amino acid uptake mechanisms in rat brain*. J. Neurosci. Res., 16, 491–503.
- [18] Volterra A., Trotti D., Tromba C., Floridi S., Rocagni G. (1994), *Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes*. J. Neurosci., 14, 2924–2932.
- [19] Taberner P.V., Pearce M.J., Watkins J.C. (1977), *Inhibition of mouse brain glutamate decarboxylase by some structural analogues of L-glutamic acid*. Biochem. Pharmacol., 26, 345–349.
- [20] Lehmann A., Hagberg H., Orwar O., Sandberg M. (1993), *Cysteine, sulphinate and cysteate: mediators of cysteine toxicity in the neonatal rat brain?* Eur. J. Neurosci., 5, 1398–1412.
- [21] Olney J.W., Ho O.L., Rhee V. (1971), *Cytotoxic effects of acidic and sulfur-containing amino acids on the important mouse central nervous system*. Exp. Brain Res., 14, 61–76.
- [22] Slivka A., Cohen G. (1993), *Brain ischemia markedly elevates levels of the neurotoxic amino acid cysteine*. Brain. Res., 608, 33–37.
- [23] Li X., Wallin C., Weber S.G., Sanberg M. (1999), *Net efflux of cysteine, glutathione and related metabolites from rat hippocampal slices during oxygen/glucose deprivation*. Brain Res., 815, 81–88.

- [24] Eimerl S., Schramm M. (1992), *An endogenous metal appears to regulate NMDA receptor mediated $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx and toxicity in cultured cerebellar granule cells*. *Neurosci. Lett.*, 137, 198–202.
- [25] Aizenman E., Lipton S.A., Loring R.H. (1989), *Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation*. *Neuron*, 2, 1257–1263.
- [26] Chai Y.B., Lipton S.A. (2000), *Redox modulation of the NMDA receptors*. *Cell Mol. Life Sc.*, 57, 1535–1541.
- [27] Mezyk S.P. (1996), *Determination of the rate constant for the reaction of hydroxyl and oxide radicals with cysteine and aqueous solution*. *Radiation Res.*, 145, 102–106.
- [28] Misra H.P. (1974), *Generation of superoxide free radical during the autooxidation of thiols*. *J. Biol. Chem.*, 249, 2151–2155.
- [29] Wang X.F., Cynader M.S. (2001), *Pyruvate released by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity*. *J. Neurosci.*, 21, 3322–3331.
- [30] Schöneich C. (1995), *Thiyl radicals, perthiyl radicals and oxidative reactions*. W: *Biothiols in Health and Disease*, Ed. Parcker L., Cadenas E., 21–47.
- [31] Frendo J. (1969), *The role of elementary sulphur and erythrocyte glutathione in the formation of sulphaemoglobin*. *Clin. Chim. Acta*, 24, 1–4.
- [32] Klatt P., Lamas S. (2000), *Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress*. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4928–4944.
- [33] Schonbeck N.D., Skalski M., Schafer J.A. (1975), *Reaction of pyridoxal 5'-phosphate, 6-aminocaproic acid, cysteine and penicillamine*. *J. Biol. Chem.*, 250, 5343–5351.
- [34] Cheng F.C., Kuo J.S., Chia L.G., Dryhurst G. (1996), *Elevated 5-S-cysteinyl dopamine/homovanillic acid ratio and reduced homovanillic acid in cerebrospinal fluid: possible markers for and potential insight into the pathoetiology of Parkinson's disease*. *J. Neural. Transm.*, 103, 433–446.
- [35] Griffith O.W., Bridges R.J., Meister A. (1978), *Evidence that γ -glutamyl cycle functions in vivo using intracellular glutathione effects of amino acids and selective inhibition of the enzymes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5405–5408.
- [36] Schulz J., Lindenau J., Seyfried J., Dichgans J. (2000), *Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration*. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4904–4911.
- [37] Zhang F., Dryhurst G. (1994), *Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: New reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease*. *J. Med. Chem.*, 37, 1084–1098.
- [38] Li H., Shen X.M., Dryhurst G. (1998), *Brain mitochondria catalyze the oxidation of 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1) to intermediates that irreversibly inhibit complex and scavenge glutathione: potential relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease*. *J. Neurochem.*, 71, 2049–2062.
- [39] Zhana F., Dryhurst G. (1993), *Oxidation chemistry of dopamine: Possible insights into the age-dependent loss of dopaminergic nigrostriatal neurons*. *Bioorg. Chem.*, 21, 392–410.
- [40] Hogg N. (2000), *Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols*. *Free Rad. Biol. Med.*, 28, 1478–1480.
- [41] Qujano C., Alvarez B., Gatti R.H., Augusto O., Radi R. (1997), *Pathways of peroxynitrite oxidation of thiols groups*. *Biochem. J.*, 322, 167–173.
- [42] Lipton S.A., Stamler J.S. (1994), *Action of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor*. *Neuropharmacology*, 33, 1229–1233.
- [43] Brorson J.R., Zhong H. (1997), *Disrupted (Ca^{+2}) homeostasis contributes to the toxicity of nitric oxide in cultured hippocampal neurons*. *J. Neurochem.*, 69, 1882–1889.
- [44] Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A. (1995), *Apoptosis and necrosis: two distinct events induced respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7162–7166.
- [45] D'Emilia D.M., Lipton S.A. (1999), *Ratio of S-nitrosohomocysteine to homocysteine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures*. *Neurosci. Lett.*, 265, 103–106.

- [46] Strange R.C., Jones P.W., Fryer A.A. (2000), *Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology*. Toxicol. Lett., 112, 357–363.
- [47] Cooper A.J. (1998), *Mechanisms of cysteine-S-conjugates of S-(N-acetyl)-L-cysteine formed during the detoxication of xenobiotics and during the metabolism of such endogenous agents as estrogens and leukotriens*. Adv. Enzymol. Related Area Mol. Biol., 72, 199–238.
- [48] Włodek P., Smoleński O. (2001), *Dlaczego ksenobiotyki (leki) mogą być nefrotoksyczne?* Nefrol. Dial. Pol., 5, 12–15.
- [49] Kharasch E.D., Hoffman G.M., Thorning D. (1998), *Role of renal cysteine conjugate β -lyases*. Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol. Ed. Purich D.L., 72, 199.
- [50] Hwang J.Y., Elfarra A.A. (1993), *Detection and mechanisms of formation of S-(6-purinyl) glutathione and 6-mercaptopurine in rat given 6-chloro-purine*. J. Pharmacol. Expt. Ther., 264, 41–52.
- [51] Birmer G., Werner M., Rosner E. et al. (1998), *Biotransformation excretion and nephrotoxicity of the hexachlorobutadiene sulfoxide*. Chem. Res. Toxicol., 11, P750.
- [52] Henschler D., Vamvakas S., Lammer M. (1995), *Increase incidence of renal tumors in cardboard workers exposed to trichloroethene*. Arch. Toxicol., 69, 291.
- [53] Soleo L., Strzelczyk R. (1999), *Xenobiotici e glutathione*. Ital. Med. Lav. Erg., 21, 302–308.
- [54] Luu N.C., Iyer R.A., Anders M.W., Ridge D.P. (2000), *Bioactivation mechanism of haloalkene cysteine S-conjugates modeled by gas-phase ion-molecule reactions*. Chem. Res. Toxicol., 13, 610–615.
- [55] Rotan R.R., Murphy T.H., Baraban J.M. (1994), *Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione*. J. Neurosci., 14, 4385–4392.
- [56] Coppola S., Ghibelli L. (2000), *GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptic signaling*. Biochem. Soc. Trans., 28, 56–61.
- [57] Huang J., Schneider R. (1990), *Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis is prevented by the drug 2-aminopurine*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 7115–7119.
- [58] Duncan R., Hershey J. (1984), *Heat shock-induced transitional alteration in Hela cells*. J. Biol. Chem., 259, 11882–11889.
- [59] Ferrer I. (1992), *The effect of cykloheximide on natural and X-ray-induced cell death in the developing cerebral cortex*. Brain. Res., 588, 351–357.
- [60] Roberts J.C. (1992), *Amino acids and their derivatives as radioprotective agents*. Amino Acid, 3, 25–52.
- [61] Virsik R.P., Harder D. (1982), *Effect on the dose-effect relationship for chromosome alterations in irradiation human lymphocytes*. Int. J. Radiat. Biol., 53, 272–281.
- [62] Hahn R., Wendel A., Flahe L. (1978), *The fate of extracellular glutathione in rat*. Biochim. Biophys. Acta, 529, 324–337.
- [63] Kelly G.S. (1998), *Clinical applications of N-acetylcysteine*. Altern. Med. Rev., 3, 114–127.
- [64] Jain A., Madsen D.C., Auld P.A., Frayer W.W., Schwartz M.K., Meister A., Martensson J. (1995), *L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, a cysteine precursors stimulates growth and normalises tissue glutathione concentrations in rats on sulfur amino acid-deficiency diet*. Nutr., 125, 851–856.
- [65] Włodek L., Rommelspacher H. (1997), *2-methyl-thiazolidine-2m4-dicarboxylic acid protect against paracetamol induced toxicity in human liver HepG2 cells*. Acta Biochim. Pol., 44, 759–766.
- [66] Xu Z., Wood T.C., Adjei A.A., Weinshilboum R.M. (2001), *Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase: radiochemical enzymatic assay biochemical properties and hepatic variation*. Drug. Metab. Dispos., 29, 172–178.
- [67] Boobis A.R., Fawthrop D.J., Seddom C.E., Speirs C.J., Davies D.S. (1992), *Variability in the pharmacokinetics and metabolism of acetaminophen*. W: Kalow W. ed. Pharmacogenetics of Drug Metabolism 32, Pergamon Press, New York, 791–812.

- [68] Fadden S.A. (1996), *Phenotypic variation in xenobiotic metabolism and adverse environmental response: focus on sulfur-dependent detoxification pathways*. Toxicology, 111, 43–65.
- [69] Berzin T.M., Zipser B.D., Rafli M.S., Kuo-Leblac V., Joncopoulos G.D., Glass D.J., Fallon J.R., Stopa E.G. (2000), *Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease*. Neurobiol. Aging, 21, 349–355.
- [70] David G., Wassely P., de Waal R.M. (1999), *Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer disease brain*. Amer. J. Pathol., 155, 2115–2125.
- [71] Lee A., Beck L., Brown R.J., Markovich D. (1999), *Identification of a mammalian brain sulfate transporter*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 263, 123–129.
- [72] Heafield M.T., Fearn S., Steventon G.B., Waring R.H., Wiliamns A.C., Sturman S.G. (1990), *Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease*. Neurosci. Lett., 110, 216–220.
- [73] Jimenez-Jimenez F.J., Molina J.A., Aguilar M.V., Jorge-Santamaria A., Mateos-Vega C.J., Gonzales-Munoz M.J., Cabrera-Valdivia F., Ayuso-Peralta L. et al. (1995), *Plasma levels of inorganic sulfates in patient with Parkinson's disease*. Acta Neurol. Scand., 92, 369–371.
- [74] Allain P., Le-Bonil A., Cordillet E., Le-Quay L., Bagheri H., Montastruc I.L. (1995), *Sulfate and cysteine levels in the plasma of patients with Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 16, 527–529.
- [75] O'Reilly B.A., Waring R.H. (1993), *Enzyme and sulphur oxidation deficiencies in autistic children with known food/chemical intolerances*. J. Orthomol. Med., 8, 198–200.
- [76] Waring R.H., Ngong J.M. (1993), *Sulphate metabolism in allergy-induced autism: relevance to the disease aetiology*. W: *Biological Perspectives in Autism*. Ed. The Autism Research Unit, University of Sunderland, 25–33.
- [77] Davies M.H., Klovra L., Waring R.H., Elias E. (1994), *Plasma cysteine and sulphate levels in patients with cirrhosis of the liver*. Clin. Sci., 87, 357–367.
- [78] Bradley H., Gough A., Sokhi R.S., Hassel A., Waring R., Emery P. (1994), *Sulfate metabolism is abnormal in patients with rheumatoid arthritis. Confirmation by in vivo biochemical findings*. J. Rheumatol., 21, 1192–1196.
- [79] Darling J.M., Mammarella M.L., Chen Q., Morris M.E. (1994), *Salicylate inhibits the renal transport of inorganic sulfate in rat membrane vesicle preparations*. Drug Metabol. Dispos., 22, 318–323.
- [80] Olivieri G., Baysang G., Meier F., Muller-Spahn E., Stahelin H.B., Brockmans M., Brock C. (2001), *N-acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity*. J. Neurochem., 76, 224–233.
- [81] Dröge W., Breitkreutz R. (1999), *N-acetyl-cysteine in the therapy of HIV-positive patients*. Opin. Nutr. Metab., Care 2, 493–498. *Role of cysteine and glutathione in HIV infection and cancer cachexia: therapeutic intervention*. W: *N-acetylcysteine*. Adv. Pharmacol., 38, 581–600.
- [82] Elias E., Waring R.H. (1989), *Impaired sulfoxidation in primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 10, 1027.
- [83] Emery P., Salmon M., Bradley H., Wordworth P., Tunn E., Bacon P.A., Waring R. (1992), *Genetically determined factors as predictors of a radiological change in patients with early symmetrical arthritis*. Br. Med. J., 305, 1387–1389.
- [84] Greenwood K., Cox P., Mehmet H., Penrice J., Amess P.N., Cady E.B., Wyatt J.S., Edwards A.D. (2000), *Magnesium sulfate treatment after transparent hypoxia-ischemia in the newborn piglet does not protect against cerebral damage*. Pediatric. Res., 48, 346–350.
- [85] Hallak M., Hosyta J.W., Custodio D., Kruger M.L. (2000), *Magnesium prevents seizure-induced reduction in excitatory amino acid receptor (kainate-4-propionic acid) binding in pregnant rat brain*. Am. J. Obstet. Gynecol., 183, 793–798.
- [86] AJA-USA (1995), *Autism, intolerance and Allergy Network-USA*. Contact: D. Tritschler, 5605 Dutchman D., Raleigh NC 27606.

- [87] Toohey JI. (1989), *Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role*. Biochem. J., 264, 625–632.
- [88] Westley A.M., Westley J. (1991), *Biological sulfane sulfur*. Anal. Biochem., 195, 63–67.
- [89] Wood J.L. (1987), *Sulfane sulfur*. Meth. Enzymol., 143, 25–29.
- [90] Szczepkowski T.W., Wood J.L. (1967), *The cystathionase-rhodanese system*. Biochim. Biophys. Acta, 139, 469–478.
- [91] Toohey JI. (1986), *Persulfide sulfur is a growth factor for cells defective in sulfur metabolism*. Biochem. Cell Biol., 64, 758–765.
- [92] Westley J.A.H., Westley L.N.C. (1983), *The sulfurtransferases*. Fundam. Appl. Toxicol., 3, 377–382.
- [93] Ogasawara Y., Isoda S., Tanabe S. (1994), *Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat*. Biol. Pharm. Bull., 17, 1535–1542.
- [94] Cavallini D., Federici G., Barboni E. (1970), *Interaction of proteins with sulfide*. Eur. J. Biochem., 14, 169–174.
- [95] Benevenga N.J. (1984), *Evidence for alternative pathways of methionine catabolism*. Adv. Nutr. Res., 6, 1–18.
- [96] Ricci G., Nardini M., Federici G., Cavallini D. (1986), *The transamination of L-cystathionine, L-cystine and related compounds by a bovine kidney transaminase*. Eur. J. Biochem., 157, 57–63.
- [97] Backlund P.S., Smith R.A. (1981), *Methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine in rat liver*. J. Biol. Chem., 256, 1533–1535.
- [98] Blom H.J., van den Elzen J.P., Yap S.H., Tangerman A. (1988), *Methanethiol and dimethylsulfide formation from 3-methylthiopropionate in human and rat hepatocytes*. Biochim. Biophys. Acta, 972, 131–136.
- [99] Valentine W.N., Toohey JI., Paglia D.E., Nakatani M., Brockway R.A. (1987), *Modification of erythrocyte enzyme activities by persulfides and methanethiol: possible regulatory role*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1394–1398.
- [100] Chen S., Zieve L., Mahadevan V. (1970), *Mercaptans and dimethyl sulfide in the breath of patients with cirrhosis of the liver. Effect of feeding methionine*. J. Lab. Clin. Med., 75, 628–635.
- [101] Matsumoto K.E., Partridge D.H., Robinson A.B., Pauling L., Flath R.A., Mon T.R., Teranishi R. (1973), *The identification of volatile compounds in human urine*. J. Chromatogr., 85, 31–34.
- [102] Skarżyński B., Szczepkowski T.W., Weber M. (1960), *Investigation on the oxidation of thiosulfate in the animals organisms*. Acta Biochim. Pol., 7, 105.
- [103] Skarżyński B., Szczepkowski T.W., Weber M. (1961), *The metabolic state of thiosulfate*. Nature, 189, 1007–1008.
- [104] Koj A., Frendo J., Janik Z. (1967), *[³⁵S] Thiosulfate oxidation by rat liver mitochondria in the presence of glutathione*. Biochem. J., 103, 791–799.
- [105] Wróbel M., Frendo J., Cannella C. (1992), *Seasonal changes in the activity of rhodanase in frog (Rana temporaria) liver*. Comp. Biochem. Physiol., 103B, 469–472.
- [106] Wróbel M., Ubuka T., Yao W.B., Abe T. (2000), *Effects of thyroxine on L-cysteine desulfuration in mouse liver*. Acta Med. Okayama, 54, 9–14.
- [107] Wróbel M. (2001), *Sulftransferase activity and sulfur compound content in Rana temporaria brain following hibernation*. Acta Neurobiol. Exp., 61, 69–72.
- [108] Wróbel M., Sura P., Srebro Z. (2000), *Sulftransferases and the content of cysteine, glutathione and sulfane sulfur in tissues of the frog Rana temporaria*. Comp. Biochem. Physiol., 125B, 211–217.
- [109] Wróbel M., Frendo J. (1992), *The effects of cAMP and some sulfur compounds upon the activity of mercaptopyruvate sulphurtransferase and rhodanese in mouse liver*. Folia Biologica, 40, 11–14.

- [110] Buzaleh A.M., Vazquez E.S., Batlle A.M. (1989), *Cyanide intoxication-I. An oral chronic animal model*. Gen Pharmac., 20, 323–327.
- [111] Porter D.W., Nealley E.W., Baskin S.I. (1996), *In vivo detoxification of cyanide by cystathionase γ -lyase*. Biochem. Pharmacol., 52, 941–944.
- [112] Taniguchi T., Kimura T. (1974), *Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the formation of the iron-sulfur chromophore of adrenal ferredoxin*. Biochim. Biophys. Acta, 364, 284–295.
- [113] Ogasawara Y., Isoda S., Tanabe S. (1995), *Reconstitution of an iron-sulfur cluster with bound sulfur: a possible source of acid-labile sulfur in biological systems*. Biol. Pharm. Bull., 18, 1045–1048.
- [114] Massey V., Edmondson D. (1970), *On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide*. J. Biol. Chem., 245, 6595–6598.
- [115] Branzoli U., Massey V. (1974), *Evidence for an active site persulfide residue in rabbit liver aldehyde oxidase*. J. Biol. Chem., 249, 4346–4349.
- [116] Agro A.F., Mavelli I., Cannella C., Federici G. (1976), *Activation of porcine heart mitochondrial malate dehydrogenase by zero valence sulfur and rhodanese*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 68, 553–560.
- [117] Sandy J.D., Davies R.C., Neuberger A. (1975), *Control of 5-aminolaevulinic synthetase activity in Rhodospseudomonas spheroides*. Biochem. J., 150, 245–257.
- [118] Yamanishi T., Tuboi S. (1981), *The mechanism of the L-cystine cleavage reaction catalyzed by rat liver gamma-cystathionase*. J. Biochem., 89, 1913–1921.
- [119] Pontremoli S., Traniello S., Enser M., Shapiro S., Horecker B.L. (1967), *Regulation of fructose diphosphatase activity by disulfide exchange*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 286–293.
- [120] Kato A., Ogura M., Suda M. (1966), *Control mechanism in the rat liver enzyme system converting L-methionine to L-cystine. 3. Noncompetitive inhibition of cystathionine synthetase-serine dehydratase by elemental sulfur and competitive inhibition of cystathionase-homoserine dehydratase by L-cysteine and L-cystine*. J. Biochem., 59, 40–48.
- [121] Pestana A., Sols A. (1970), *Reversible inactivation by elemental sulfur and mercurials of rat liver serine dehydratase and certain sulphydryl enzymes*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 522–529.
- [122] Conner J., Russell P.J. (1983), *Elemental sulfur: a novel inhibitor of adenylate kinase*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 113, 348–352.
- [123] Russell P.J., Conner J., Sisson S. (1984), *Sulfur specifically inhibits adenylate kinase in assays for creatine kinase*. Clin. Chem., 30, 1555–1557.
- [124] Hargrove J.L., Wichman R.D. (1987), *A cystine-dependent inactivator of tyrosine aminotransferase co-purifies with gamma-cystathionase (cystine desulfurase)*. J. Biol. Chem., 262, 7351–7357.
- [125] Murakami Y., Kameji T., Hayashi S. (1984), *Cysteine-dependent inactivation of hepatic ornithine decarboxylase*. Biochem. J., 217, 573–580.
- [126] Fanelli S.L., Castro G.D., de Toranzo E.G.D., Castro J.A. (1998), *Mechanisms of the preventive properties of some garlic components in the carbon tetrachloride-promoted oxidative stress. Diallyl sulfide; diallyl disulfide; allyl mercaptan and allyl methyl sulfide*. Res. Commun. Mol. Pathology Pharmacol., 102, 163–174.
- [127] Sheen L.Y., Chen H.W., Kung Y.L., Liu C.T., Lii C.K. (1999), *Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets*. Nutr. Cancer, 35, 160–166.
- [128] Perchellet J.P., Perchellet E.M., Abney N.L., Zirnstein J.A., Belman S. (1986), *Effects of garlic and onion oils on glutathione peroxidase activity, the ratio of reduced/oxidized glutathione and ornithine decarboxylase induction in isolated mouse epidermal cells treated with tumor promoters*. Cancer Biochem. Biophys., 8, 299–312.
- [129] Everett S.A., Folkes L.K., Wardman P. (1994), *Free-radical repair by a novel perthiol: reversible hydrogen transfer and perthiyl radical formation*. Free Rad. Res., 20, 387–400.

- [130] Everett S.A. (1995), *Antioxidant drug design: a comparison of thiol and prooxidant reaction mechanisms*. W: *Biothiols in Health and Disease*. Ed. Packer L. and Cadenas E., New York, 49–64.
- [131] Włodek L., Wróbel M., Czubak J. (1993), *Transamination and transsulphuration of L-cysteine in Ehrlich ascites tumor cells and mouse liver. The nonenzymatic reaction of L-cysteine with pyruvate*. Int. J. Biochem., 25, 107–112.
- [132] Apple M.A., Greenberg D.M. (1969), *Inhibitory effect of DL-2-mercapto-3-hydroxypropanal on growth of transplantable cancers in mice*. Cancer Chem. Reports, 53, 195–198.
- [133] Apffel C.A., Walker J.E., Issarescu S. (1975), *Tumor rejection in experimental animals treated with radioprotective thiols*. Cancer Res., 35, 429–437.
- [134] Tatsuta M., Iishi H., Yamamura H., Baba M., Mikuni T., Tanigushi H. (1988), *Inhibitory effect of prolonged administration of cysteamine on experimental carcinogenesis in rat stomach induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*. Int. J. Cancer, 41, 423–426.
- [135] Marquardt H., Sapozink M.D., Zedeck M.S. (1974), *Inhibition by cysteamine-HCl of oncogenesis induced by 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene without affecting toxicity*. Cancer Res., 34, 3387–3390.
- [136] Dausch J.G., Nixon D.W. (1990), *Garlic: A review of its relationship to malignant disease*. Prev. Med., 19, 346–361.
- [137] Agarwal K.C. (1996), *Therapeutic actions of garlic constituents*. Med. Res. Rev., 16, 111–124.
- [138] Fukushima S., Takada N., Hori T., Wanibuchi H. (1997), *Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion*. J. Cell. Biochem. Suppl., 27, 100–105.
- [139] Singh S.P., Abraham S.K., Kesavan P.C. (1995), *In vivo radioprotection with garlic extract*. Mutation Res., 345, 147–153.
- [140] You W.C., Blot W.J., Chang Y.S., Ershow A., Yang Z.T., Henderson B.E., Fraumeni J.F., Wang T.G. (1989), *Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer*. J. Natl. Cancer Inst., 81, 162–164.
- [141] Dorant E., van den Brandt P.A., Goldbohm R.A. (1996), *A prospective cohort study on the relationship between onion and leek consumption, garlic supplement use and the risk of colorectal carcinoma in The Netherlands*. Carcinogenesis, 17, 477–484.
- [142] Knowles L.M., Milner J.A. (1998), *Depressed p34^{cdc2} kinase activity and G₂/M phase arrest induced by diallyl disulfide in HCT-15 cells*. Nutr. Cancer, 30, 169–174.
- [143] Pinto J.T., Qiao C., Xing J., Rivlin R.S., Protomastro M.L., Weissler M.L., Tao Y., Thaler H., Heston W.D.W. (1997), *Effect of garlic thioallyl derivatives on growth, glutathione concentration, and polyamine formation of human prostate carcinoma cells in culture*. Am. J. Clin. Nutr., 66, 398–405.
- [144] Sundaram S.G., Milner J.A. (1996), *Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture*. Biochim. Biophys. Acta, 1315, 15–20.
- [145] Iciek M., Rokita A., Włodek L. (2001), *Effects of diallyl disulfide and other donors of sulfane sulfur on the proliferation of human hepatoma cell line (HepG2)*. Neoplasma, 48, 307–312.
- [146] Wróbel M., Włodek L. (1997), *Effects of thiazolidine-4(R)-carboxylates and other low-molecular-weight sulfur compounds on the activity of mercaptopyruvate sulfurtransferase, rhodanese and cystathionase in Ehrlich ascites tumor cells and tumor-bearing mouse liver*. Amino Acids, 12, 309–314.
- [147] Stamler J.S. (1995), *S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups*. Current Top. Microbiol. Immunol., 196, 19–36.
- [148] Ajitkumar P., Cherayil J.D. (1988), *Thionucleosides in transfer ribonucleic acid: diversity, structure, biosynthesis, and function*. Microbiological Rev., 52, 103–113.
- [149] Wong T.W., Harris M.A., Jankowicz C.A. (1974), *Transfer ribonucleic acid sulfurtransferase isolated from rat cerebral hemispheres*. Biochemistry, 13, 2805–2812.
- [150] Wong T.W., Harris M.A., Morris H.P. (1975), *The presence of an inhibitor of RNA sulfurtransferase in Morris hepatomas*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 1137–1145.

- [151] Renoux G., Renoux M. (1977), *Thymus-like activities of sulphur derivatives on T-cell differentiation*. J. Exp. Med., 145, 466–471.
- [152] Pompidou A., Delsaux M.C., Telvi L., Mace B., Coutance F., Falkenrodt A., Lang J.M. (1985), *Isoprinisine and imuthiol, two potentially active compounds in patients with AIDS-related complex symptoms*. Cancer Res., 45, 4671–4673.
- [153] Lang J.M., Touraine J.L., Trepo C., Choutet P., Kirstetter M., Falkenrodt A., Herviou L., Livrozet J.M., Retornaz G., Touraine F. (1988), *Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of ditiocarb sodium ('Imuthiol') in human immunodeficiency virus infection*. Lancet, 2, 702–706.
- [154] Massey V., Williams C.H., Palmer G. (1971), *The presence of S degrees-containing impurities in commercial samples of oxidized glutathione and their catalytic effect on the reduction of cytochrome c*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 730–738.
- [155] Prutz W.A. (1993), *Sulfane-activated reduction of cytochrome c by glutathione*. Free Rad. Res. Commun., 18, 159–165.
- [156] Włodek P.J., Iciek M.B., Milkowski A., Smoleński O.B. (2001), *Various forms of plasma cysteine and its metabolites in patients undergoing hemodialysis*. Clin. Chim. Acta, 304, 9–18.
- [157] Srebro Z., Lach H. (1972), *X-ray- and UV-induced increase in number of cysteine-rich periventricular glial cells in the brains of rats and mice*. Acta Biol. Sci. Hung., 23, 145–151.
- [158] Geren C.R., Olomon C.M., Jones T.T., Ebner D.E. (1977), *2-Mercaptoethanol as a substrate for liver alcohol dehydrogenase*. Arch. Biochem. Biophys., 179, 415–419.
- [159] Hannestad U., Margheri S., Sorbo B. (1989), *A sensitive gas chromatographic method for determination of protein-associated sulfur*. Anal. Biochem., 178, 394–398.
- [160] Ogasawara Y., Ishii K., Togawa T., Tanabe S. (1993), *Determination of bound sulfur in serum by gas dialysis/high-performance liquid chromatography*. Anal. Biochem., 215, 73–81.
- [161] Ogasawara Y., Ishii K., Togawa T., Tanabe S. (1991), *Determination of trace amounts of sulfide in human red blood cells by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection after derivatization with p-phenylenediamine and iron (III)*. Analyst, 116, 1359–1363.
- [162] Togawa T., Ogawa M., Nawata M., Ogasawara Y., Kawanabe K., Tanabe S. (1992), *High performance liquid chromatographic determination of bound sulfide and thiosulfate at their low levels in human serum by pre-column fluorescence derivatization with monobromobimane*. Chem. Pharm. Bull., 40, 3000–3004.
- [163] Miller R.W. (1970), *Estimation of labile sulfide content of cellular components*. Anal. Biochem., 35, 181–192.
- [164] Toohey J.I. (1983), *Ketomethylthiobutyric acid formation from methylthioadenosine: a diffusion assay*. Arch. Biochem. Biophys., 223, 533–542.